UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
CANCÉROLOGIE – MÉDECINE –SANTÉ

Laboratoire de développement normal et pathologique des mélanocytes
Inserm U1021 / CNRS UMR3347 – Institut Curie

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par :

Roselyne WAGNER

Rôle des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes et la pathogénie du Vitiligo

Date de soutenance : 25/09/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Véronique DELMAS	DR CNRS (Institut Curie, Orsay)
Rapporteurs :	Jean-Loup DUBAND	DR CNRS (Institut Mondor, Créteil)
	Marc BILLAUD	DR CNRS (Institut Albert Bonniot, Grenoble)
Examinateurs :	Alain TAIEB	PU-PH (CHU Saint André de Bordeaux)
	Christine DUVAL	Chercheur (L'Oréal Research & Innovation)
	François DAUTRY	Professeur ENS Cachan (ENS Cachan)
Membre invité :	Lionel LARUE	DR Inserm (Institut Curie, Orsay)

A tous ceux qui occupent une place
particulière dans mon cœur,

« *The truth is rarely pure and never simple*.»
Oscar Wilde

« *Pour accomplir de grandes choses,*
il ne suffit pas d'agir, il faut rêver ;
il ne suffit pas de calculer, il faut y croire.»
Anatole France

REMERCIEMENTS :

J'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse en commençant par le Dr. Jean Loup Duband qui a pu suivre l'évolution de ce travail depuis ses débuts lors de mes comités de thèse. Vos conseils et notamment vos explications sur le « joyeux bordel » de la délamination des crêtes neurales ont toujours été très intéressantes et instructives. Je vous remercie également pour votre participation à l'achèvement de ce manuscrit de thèse en tant que rapporteur, vos remarques en ont sans aucun doute amélioré la qualité.

Je remercie également le Dr. Marc Billaud pour sa participation en tant que rapporteur à mon jury de thèse, pour ses précieuses remarques, ainsi que le temps passé à examiner ce manuscrit.

Je tenais à remercier le Pr. Alain Taieb, le Dr. Christine Duval et le Pr. François Dautry pour avoir accepté de faire partie de ce jury ainsi que pour le temps consacré à lire et juger ce travail.

Mes remerciements vont ensuite au Dr. Lionel Larue qui a accepté que je réalise ma thèse dans son laboratoire. J'ai beaucoup appris à vos cotés durant ces quatre années notamment la rigueur, la méticulosité mais aussi à défendre mes idées de façon convaincante. Je vous remercie également de nous encourager constamment participer à des congrès nationaux ou internationaux et pour m'avoir envoyé au Japon pour une collaboration. J'ai pu découvrir une culture passionnante grâce à vous.

Je souhaite remercier le Dr. Véronique Delmas qui a supervisé cette thèse durant ces quatre années. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse sur un sujet aussi passionnant que le Vitiligo et le développement embryonnaire des mélanocytes. Vous m'avez notamment appris à avoir l'esprit critique et à présenter mes données de façon à raconter une histoire intéressante et convaincante. Je n'oublierai pas vos conseils.

J'aimerais remercier aussi le Dr. Heinz Arnheiter avec qui j'ai eu des discussions très intéressantes sur les concepts de la détermination des mélanocytes. Je vous remercie également pour votre participation à la correction de ce manuscrit et pour toutes vos présentations orales passionnantes qui nous ont permis d'élargir notre culture scientifique.

Je tiens ensuite à remercier nos collaborateurs sur le projet du Vitiligo qui ont permis à ce projet de recherche d'avoir un aspect si complet. Merci à : Muriel Cario-André, Alain Taieb, Yvon Gauthier, Khaled Ezzedine, Laïla Benzekri, Eirikür Steingrimsson et Sébastien Lepreux.

Je souhaite remercier également les plateformes de l'Institut Curie qui ont participé à la réalisation de ce projet de thèse. Je remercie Adlin Thadal, Jean Didier Mam, Fabrice Cordelière, Sophie Dodier-Leboucher, Héléna Harmange et Fréderic Bertrand.

I would like to thank Dr. Takahiro Kunisada and Dr. Tsutomu Motohashi who kindly welcomed me into their laboratory. I learned a lot with you, both from a technical and a cultural point of view and I will never forget it.

I would like to thank the people from Dr. Takahiro's lab who kindly welcomed me during my stay in Gifu. I would like to thank, in particular, Natsuki Watanabe and Reiko who took great care of me during my stay.

Je tenais également à remercier le Dr. Evelyne Sage pour m'avoir prêté son bureau lors de la rédaction de cette thèse et pour les discussions intéressantes que nous avons eu à diverses occasions.

Je souhaite également remercier Guy Le Meur pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci.

Ensuite mes remerciements les plus chaleureux vont à tous mes collègues que j'ai côtoyés ces quatre dernières années et qui m'ont permis de me sentir au laboratoire presque comme dans une seconde famille. Beaucoup d'entre vous sont devenus des amis que j'espère bien conserver par la suite. Nous avons passé de très bons moments ensemble et je conserverai des souvenirs chaleureux de chacun d'entre vous. Merci à : Maria Wehbe-Poke, Mélanie Domingues-Pinto, Audrey Bechadergue, Delphine Champeval, Madeleine Le Coz, Jacky Bonaventure, Gwendoline Gros, Juliette Bertrand, Valérie Petit, Irina Berlin, Leslie Gandji, Malika Foy, Nathalie Rocques, Ana Borges-Figuereido, Elena Sena, Franck Gesbert, Caroline Borday, Zackie Aktary, Ewa Kotula-Pasquereau, Florian Rambow, Michael Hamm, Cécile Milet, Laura Besnier, Alain Rubod, Jean-Louis Plouhinec, Céline Barbotin, Christophe Alberti, Antoine Forget, Sara Maria Cigna, Morgane Morabito, Julie Talbot, Saber Ben Mimoun, Laure Bihannic, Océane Anezo, Frédérique Maczkowiak, Laurence Mery, Géraldine Liot, Magalie Larcher et Véronique Piveux.

Enfin, mes derniers remerciements vont aux personnes qui me sont les plus chères : mes parents, Charlotte et Alexandre. Vous avez su, chacun à votre manière, tour à tour, me pousser, me soutenir, me changer les idées et me réconforter durant ces années. J'ai toujours pu compter sur vous et je vous en remercie sincèrement, rien n'aurait été possible sans vous.

Merci à vous, cette thèse n'aurait certainement pas eu la même saveur sans la présence de chacun d'entre vous.

SOMMAIRE :

REMERCIEMENTS : 7

SOMMAIRE : 9

SOMMAIRE DES FIGURES : 14

ABRÉVIATIONS : 16

RÉSUMÉ : 20

ABSTRACT: 22

INTRODUCTION 26

1. LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES MÉLANOCYTES DE LA PEAU 26

1.1. La première vague du développement des mélanocytes 26

1.1.1. Les cellules des crêtes neurales 26

1.1.1.a La formation des CCN 26

1.1.1.b La spécification des CCN 28

1.1.1.c Les voies de migrations des CCN 29

1.1.2. Le développement des mélanocytes de la peau à partir des cellules des crêtes neurales 30

1.1.2.a Chez le poulet 31

1.1.2.b Chez la souris 31

1.1.2.c Chez le poisson zèbre 32

1.1.3 La détermination des mélanoblastes de la première vague 33

1.1.3.a Les facteurs de croissance : BMP4 et WNT 34

1.1.3.b Les facteurs de transcription : PAX3 et SOX10 35

1.1.3.c Les protéines du destin mélanocytaire : MITF et KIT 36

1.1.4. Les protéines de la migration, de la prolifération et de la survie des mélanoblastes 37

1.1.4.a MITF, KIT et DCT 37

1.1.4.b β-CATÉNINE 38

1.1.4.c EDNRB et les endothélines 39

1.1.4.d PAX3 39

1.1.4.e Les protéines de la migration : RAC1, P-REX1, FASCIN-1 39

1.1.5. La voie de signalisation WNT canonique 40

1.2. La deuxième vague du développement des mélanocytes 42

1.2.1. Le développement des cellules de Schwann chez la souris 42

1.2.1.a Les cellules précurseurs de Schwann 42

1.1.3.b La différenciation des SCP en cellules de Schwann 43

1.1.3.c La formation et l'organisation du nerf chez l'adulte 45

1.2.2. Le développement des mélanocytes depuis les cellules précurseurs de Schwann 46

1.2.2.a La découverte d'une seconde vague de mélanoblastes 46

1.2.2.b La mise en évidence de l'origine des mélanoblastes depuis les SCP et ses controverses 47

1.2.2.c Le développement des mélanoblastes de la seconde vague 49

1.2.3. Les protéines de la détermination des cellules de Schwann et des mélanoblastes de la seconde vague 51

1.2.3.a Les facteurs de transcription : FOXD3 et SOX2 51
1.2.3.b Les facteurs de croissance : NRG1, IGF1, PDGF et HGF 53
1.2.3.c La signalisation WNT/β-CATÉNINE 53
1.2.3.d TUJ1 54

1.3. Les indications d'un lien embryonnaire entre mélanocytes et cellules de Schwann chez l'adulte 54
1.3.1. La régénération et la reprogrammation cellulaire 54
1.3.2 Les cellules souches des crêtes neurales chez l'adulte 55
1.3.3. La neurofibromatose 56

2. LES MÉLANOCYTES 58
2.1. Description 58
2.1.1. Les localisations et les fonctions des mélanocytes 58
2.1.1.a Les mélanocytes et leurs fonctions 58
2.1.1.b Les mélanocytes classiques de la peau 59
2.1.2. La mélanine 60
2.1.2.a L'eumélanine et la phéomélanine 60
2.1.2.b La production et le transfert de la mélanine 61
2.1.2.c La régulation de la pigmentation 62

2.2. La composition et l'organisation de la peau 63
2.2.1. La structure et les fonctions de la peau 63
2.2.2. L'organisation de l'épiderme 64
2.2.3. La composition cellulaire de l'épiderme 66
2.2.4. Le mélanocyte dans son environnement cellulaire 66

2.3. L'homéostase de la peau 67
2.3.1. La localisation des cellules souches dans la peau 67
2.3.2. Les cellules souches mélanocytaires chez les mammifères 68
2.3.2.a Les MSC du follicule pileux 68
2.3.2.b Le renouvellement des mélanocytes de l'épiderme 69

3. LE VITILIGO, PATHOLOGIE DUE À LA DISPARITION DES MÉLANOCYTES 71
3.1. Description 71
3.1.1. La prévalence et les caractéristiques cliniques 71
3.1.2. Phénomène de Koebner 71

3.2. Les origines et l'étiologie de la maladie 72
3.2.1. Des prédispositions génétiques 73
3.2.2. Les implications du système immunitaire 73
3.2.2.a Les maladies auto-immunes associées 73
3.2.2.b Un dérèglement immunitaire 74
3.2.3. Un désordre biochimique, neuropeptidique et oxydatif 75
3.2.3.a Le désordre biochimique et neuropeptidique 75
3.2.3.a Une balance oxydative perturbée 77
3.2.3.c Les effets du stress oxydatif sur les mélanocytes 78
3.2.4. La mélanocytorrhagie : un défaut d'adhésion des mélanocytes 79

3.2.4.a La théorie de la mélanocytorrhagie 79
3.2.4.b L'adhésion du mélanocyte à la lame basale 80
3.2.4.c L'adhésion du mélanocyte aux kératinocytes 80
3.2.4.d La E-CADHÉRINE 81

3.3. Les thérapies 83
3.3.1. Les thérapies immuno-modulatrices 83
3.3.2. Les photothérapies 84
3.3.3. La dépigmentation 84

OBJECTIFS DE LA THÈSE : 88

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS : 92

Partie 1 : L'ALTÉRATION DE LA E-CADHÉRINE DANS LES MÉLANOCYTES EST UN ÉVÈNEMENT PRÉCOCE DANS L'ÉTIOLOGIE DU VITILIGO 94
1.1. Contexte et objectifs 94
1.2. Résultats 94
Article 1 : 96
Altered E-cadherin level and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo 96

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : phénotype de pigmentation dû à l'invalidation de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes 114
Contexte et objectifs 114

Partie 2 : LA STABILISATION DE β-CATÉNINE DANS LE LIGNAGE MÉLANOCYTAIRE AFFECTE SPÉCIFIQUEMENT LES MÉLANOBLASTES MIGRANT DORSO-VENTRALEMENT 122
2.1. Contexte et objectifs 122
2.2. Résultats 124
Article 2 : 126
β-CATENIN differentially affects melanoblast development in the skin of the trunk and the paws 126

DISCUSSION : 158
Partie 1 – Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE dans le Vitiligo 158
Le défaut d'adhésion des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo 158
Un polymorphisme des gènes *Cdh1* et *Ddr1* mais pas de déficit d'adhésion global 159
Les causes de la diminution de l'expression membranaire de E-CADHÉRINE 160
Le défaut d'adhésion des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo et le déclenchement de l'apoptose 161
Un défaut d'adhésion des mélanocytes et les autres théories de la pathogénie du Vitiligo 162
Le défaut d'adhésion et le renouvellement les cellules souches mélanocytaires 163

Partie 2 – Le rôle des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE lors du développement embryonnaire des mélanocytes 164
Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE dans la prolifération des mélanoblastes 164
Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE dans la migration des mélanoblastes 165
Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE pour la présence des mélanoblastes dans l'épiderme 166
L'adhésion dans la détermination des SCP 167
β-CATÉNINE est-elle l'effecteur de la détermination des mélanoblastes ou le chef d'orchestre de la détermination des SCP ? 168
Le rôle de β-CATÉNINE dans la prolifération cellulaire 169
Les territoires anatomiques colonisés par les deux vagues de mélanoblastes 170
L'importance de la double origine des mélanoblastes pour les mélanocytes adultes et la transformation tumorale 171

BIBLIOGRAPHIE : 175

ANNEXE 1 : Modèles murins de référence 207

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

SOMMAIRE DES FIGURES :

Figure 1 : *Formation des CCN et carte des différents dérivés des CCN le long de l'axe neural chez le poulet ……..……26*
Figure 2 : *Voies de migrations des CCN chez le poulet, le poisson zèbre et la souris……..29*
Figure 3 : *Développement des mélanocytes depuis les CCN chez la souris……..31*
Figure 4 : *Migration des cellules pigmentaires chez le poisson zèbre……..32*
Figure 5 : *Expression des facteurs de croissance WNT et BMP dans l'ectoderme du poulet au cours de la neurulation……..33*
Figure 6 : *Les protéines et les facteurs de transcription impliqués dans l'activation de M-Mitf …… ……..35*
Figure 7: *La voie de signalisation WNT canonique……..40*
Figure 8 : *Protéines exprimées durant la différenciation des cellules de Schwann……..42*
Figure 9 : *Différenciation des cellules de Schwann……..43*
Figure 10 : *Composition d'un nerf adulte……..44*
Figure 11 : *Les deux vagues du développement des mélanocytes chez la souris……46*
Figure 12 : *Le développement des mélanocytes chez la souris, le poulet et le poisson zèbre.49*
Figure 13 : *Réseau de gènes du développement et de l'induction des CCN……..51*
Figure 14 : *Les différentes localisations et fonctions des mélanocytes dans l'organisme.....58*
Figure 15 : *Voies de synthèses de la mélanine……..59*
Figure 16 : *Mécanismes de production et de tranfert des mélanosome.……..61*
Figure 17 : *Structure de la peau……..63*
Figure 18 : *Composition et organisation de l'épiderme……../….64*
Figure 19 : *Les cellules souches épidermiques……..67*
Figure 20 : *Cellules souches mélanocytaires du follicule pileux……..68*
Figure 21 : *Patients atteints de Vitiligo non segmentaire et segmentaire.……70*
Figure 22 : *Les dépigmentations pouvant être causées par le phénomène de Koebner……71*
Figure 23 : *La réponse immunitaire acquise……74*
Figure 24 *: Réactions enzymatiques intracellulaires conduisant à la formation de catécholamines et d'H_20_2……76*
Figure 25 : *Production et élimination des différents dérivés réactifs de l'oxygène. ……77*
Figure 26 : *Expression des cadhérines selon la localisation des mélanocytes dans la peau..80*
Figure 27 : *Les protéines des jonctions adhérentes……81*

ABRÉVIATIONS :

6-BH4 : 6-tétrahydroptérine
7-BH4 : 7-tétrahydroptérine
α-MSH : alpha-melanocyte stimulating hormone
ADN : acide désoxyribonucléique
APC : adenomatosis polyposis coli
AQP3 : aquaporin-3
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
BLBP / FABP7 / BFABP: brain lipid binding protein / fatty acid binding protein 7 / brain fatty acid binding protein
BMP : bone morphogenic protein
Bcl-9 : B-cell CLL/lymphoma 9
b-cat : β-caténine
BrdU : Bromodeoxyuridine
CCN : cellules des crêtes neurales
CCN3 : nehproblastoma overexpressed = NOV
CK1 : Casein kinase 1
Dct : Daupachrome tautomérase
DDR1 : Discoidin domain receptor 1
DKK1 : Dickkopf 1
Dvl /Dsl : Dishveled
E-cad : E-cadhérine
EDN3 : Endothéline 3
EDNRB : Endothelin receptor B
ErbB : estrogen receptor-b oncogene
FGF : fibroblast growth factor
FoxD3 : forkhead-box transcription factor D3
Fzd : Frizzled
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GP : glutathione péroxidase
GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta
HDAC1 : histone deacetylase 1
HeNe : laser hélium néon
IFN-δ : interferon gamma
IGF1 : insulin growth factor 1
IL-2 : Interleukin-2
JDE : Jonction Dermo-Epidermique
KIT-L : Kit Ligand / Steel / MGF / SCF
QSR : Q switch ruby

LEF : Lymphoïd enhancer factor
MAG : myelin-associated glycoprotein
MAPK : mitogen activated protein kinase
MBP : myelin basic protein
MC1R : Melanocortin Receptor 1
MEC : matrice extra-cellulaire
MEL : monochromatic excimer laser
miARN : micro ARN
Mitf : Micropthalmia transcription factor
MSA : migrating staging area
MSCs : Melanocytes Stem Cell ou cellule souche mélanocytaire
NBUVB : Narrow-band ultraviolet B
NF1 : neurofibromin 1
NRG : Neureguline
Pax3 : Paired-box gene 3
P-cad : P-cadhérine
PDGF : platelet-derived growth factor
PLP : proteolipid-protein
PMP22 : peripheral myelin protein 22
P0 : protein zero
P-Rex1 : Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Trisphosphate-Dependent Rac Exchange Factor 1
RAC : Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAS : rat sarcomas
RSK1 : Ribosomal protein S6 kinase 1
SCF/MGF : Stem cell factor / mast cell growth factor / Steel
SCP : Schwann cell precursors ou précurseur des cellules de Schwann
siARN : silencing ARN
Snai2 : snail homolog 2
Snail 2 : Zinc finger protein SNAI2
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SNPs : single-nucleotide polymorphisms
SOD : superoxide dismutase
Sox : SRY-related high-mobility group box
Src : Rous sarcoma oncogene cellular homolog
TCF : T-cell factor
TEM : transition epithélio-mésenchymateuse
TFEB, TFEC, TFE3 : trancription factor EB, EC, E3
TGFβ : transforming growth factor beta
TN : Tube Neural
TNF-α : tumor necrosis factor-alpha
Trp1 : Tyrosinase protein related 1

Tyr : Tyrosinase
UVA, UVB : ultraviolet de type A, de type B
VNS : Vitiligo non segmentaire
VS : Vitiligo segmentaire
Wnt : Wingless-related integraction site
Wt : wild type
WTX : X-linked intracellular inhibitor of Wnt/β-caténine signaling
Xgal : 5Br-4Cl-3-indonyl-β-D-galactopyranoside
Zic1 : Zic family member 1

Gène et protéine : par soucis de compréhension, les gènes seront écris en minuscule et en italique tandis que les protéines seront écrites en majuscule, par exemple le gène *Mitf* et la protéine MITF.

RÉSUMÉ :

La couleur de la peau résulte de la synthèse et de la distribution de la mélanine dans l'épiderme et les poils. La mélanine est un pigment produit par les mélanocytes, des cellules dérivées de la crête neurale. Les mélanocytes transfèrent la mélanine aux kératinocytes environnants et forment l'unité épidermique de mélanisation constituée d'un mélanocyte pour 40 kératinocytes. Les interactions entre les mélanocytes et les kératinocytes sont assurées principalement par la E-CADHÉRINE, une protéine responsable de la formation de jonctions adhérentes entre deux cellules adjacentes. L'ancrage de ses jonctions au cytosquelette est assuré par l'intermédiaire de la β-CATÉNINE. Le rôle de ces protéines n'est pas simplement adhésif, elles interviennent aussi dans de nombreux processus développementaux et assurent le maintien de l'architecture de l'épiderme. De plus, β-CATÉNINE est une protéine centrale de la voie de signalisation WNT/β-CATÉNINE essentielle dans la formation du lignage mélanocytaire. Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE, d'une part dans l'homéostase des mélanocytes et d'autre part dans le développement embryonnaire d'un type particulier de mélanocytes, ceux peuplant l'extrémité des membres.

Dans la première partie, nous avons étudié l'implication de ces protéines dans une leucodermie circonscrite acquise, le Vitiligo. Dans cette pathologie, les mélanocytes disparaissent, générant des zones de peau dépigmentées. L'une des hypothèses invoquées est un défaut adhésion des mélanocytes et leur élimination de la lame basale vers les couches supérieures de l'épiderme. Nous avons montré que la présence de E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE à la membrane est altérée dans les mélanocytes Vitiligo avant leur disparition de l'épiderme, au niveau de la peau pigmentée des patients. L'altération de E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE à la membrane des mélanocytes est corrélée à une localisation suprabasale de ces cellules et une perturbation de l'unité épidermique de mélanisation. A l'aide de systèmes de peaux reconstruites *in vitro* et de souris déficientes en E-CADHÉRINE dans les mélanocytes, nous avons démontré un rôle essentiel de E-CADHÉRINE pour l'adhésion des mélanocytes à la lame basale de l'épiderme en présence de stress mécanique et oxydatif, deux facteurs aggravants de la dépigmentation dans le Vitiligo. Nous proposons que l'altération de E-CADHÉRINE est un événement précoce dans la pathologie du Vitiligo qui reste silencieux jusqu'à ce que des stress mécaniques ou oxydatifs accélèrent la perte des mélanocytes (Wagner et al., 2015).

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux rôles des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes. Nous avons examiné la possibilité de générer des mélanoblastes à partir des dérivés des cellules de crêtes neurales qui emprunteraient la voie ventrale de migration et non la voie dorso-latérale classiquement décrite. Nous avons montré que les mélanoblastes produits à partir de la voie ventrale dérivent de cellules précurseurs se spécifiant à E14 en mélanoblastes ou en cellules de Schwann. A l'aide d'un mutant gain de fonction de β-CATÉNINE, nous avons mis en évidence que l'activation de la signalisation de β-CATÉNINE induit la spécification des mélanocytes au détriment des cellules de Schwann. La E-CADHÉRINE n'intervient pas dans la spécification des mélanoblastes issus de la voie ventrale mais est impliquée dans l'expansion des mélanoblastes issus de la voie dorso-latérale au niveau des membres.

Ces résultats démontrent un rôle critique de E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE dans l'homéostase des mélanocytes dans des conditions de stress et dans la régulation du développement des mélanocytes.
Mots clés : E-CADHÉRINE, β-CATÉNINE, Vitiligo, mélanocytes, spécification.

ABSTRACT:

Skin pigmentation results from the synthesis and the distribution of melanin by melanocytes. Melanocytes are neural crest derived cells that produce and transfer melanin to their surrounding keratinocytes. One melanocyte makes contacts with approximately 40 keratinocytes, forming the so-called epidermal melanin unit. Adhesion between melanocytes and keratinocytes is mediated by the adhesive protein E-CADHERIN, which is responsible for the formation of adherens junctions. These junctions are anchored to the cytoskeleton via β-CATENIN. The main function of adhesive proteins is to form cell-cell junctions and to maintain epidermal architecture. β-CATENIN is a central component of the WNT signalling pathway, which is implied in the development of the melanocyte lineage. During this PhD we were interested in the potential roles of E-CADHERIN and β-CATENIN proteins first in melanocyte homeostasis and second in melanocyte development in the mouse limb.

In the first part of this PhD project, we studied the role of these proteins in an acquired leucoderma: the Vitiligo disease. In this disease, depigmented areas appears in the skin due to melanocyte loss. One hypothesis for this loss is a defect in adhesive proteins of melanocytes, leading to melanocyte detachment and loss. We examined pigmented skin biopsies of patients with or without Vitiligo and observed that membranous staining of E-CADHERIN and β-CATENIN is absent from, or discontinuously distributed across melanocyte membranes of Vitiligo patients long before clinical lesions appeared. The abnormal distribution of E-CADHERIN correlated with lower melanocyte numbers in the basal epidermal layer and higher melanocyte numbers in the suprabasal layer. Using reconstructed human epidermis and mouse models with defective E-CADHERIN expression in melanocytes, we showed that E-CADHERIN is required for melanocyte adhesiveness to the basal layer under oxidative and mechanical stress. These observations establish a link between pre-clinical, cell-autonomous defects in Vitiligo melanocytes and known environmental stressors accelerating disease onset. Our results implicate a primary predisposing skin defect affecting melanocyte adhesiveness, which under stress conditions, leads to the disappearance of melanocytes and clinical Vitiligo (Wagner et al., 2015).

In the second part of this PhD project, we examined the role of these two proteins E-CADHERIN and β-CATENIN in the development of melanoblasts from the ventrally migrating pathway in contrast to the laterally migrating pathway previously described. We observed that ventrally migrating melanoblasts arose from precursors specified at E14 in melanoblasts or Schwann cells. Using a β-CATENIN gain of function mouse model, Tyr::Cre ; bcatΔex3 we observed that β-CATENIN signalling activation induced melanoblast specification at the expense of Schwann cells. We also demonstrated that E-CADHERIN loss in melanocytes (Tyr::Cre ; EcadF/F) decreased dorso-laterally migrating melanoblast expansion in the limb.

Taken together, these results point to a critical role for E-CADHERIN and β-CATENIN in maintaining melanocyte homeostasis under stress conditions and regulating melanocyte development.

Keywords: E-CADHERIN, β-CATENIN, Vitiligo, melanocyte, specification.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les variations de la pigmentation de la peau humaine semblent exister depuis l'homme de Néandertal. Des analyses ADN sur des squelettes de néandertaliens ont mis en évidence un variant du gène MC1R (melanocortin receptor 1), gène connu pour affecter la pigmentation (Lalueza-Fox et al., 2007; Lin and Fisher, 2007). La peau est aussi l'organe le plus accessible et le plus facilement observable de l'organisme ce qui explique l'intérêt dont elle a fait l'objet dès l'antiquité, d'autant plus que les flux migratoires, les activités commerciales, les conflits, mettant en contact les populations les plus diverses, ont produit l'évidence d'une variation de la pigmentation parmi les Hommes. Si l'on trouve chez l'historien grec Hérodote (en 484 – 430 av. J.-C.) mention de l'observation de cette variation, le premier cas reporté de maladie pigmentaire semble être un cas de Vitiligo en 2200 av. J.-C. en Iran (Prasad and Bhatnagar, 2003; Westerhof, 2006). La recherche des causes de la variation de la pigmentation humaine a fait l'objet de nombreuses théories. Les hypothèses les plus diverses et imaginatives ont vues le jour : Aristote (384-322 av. J.-C.) incriminait l'alimentation trop cuite, Onesicrite (philosophe cynique grec, vers 380-305 av. J.-C.) les chutes d'eau chaude, tandis qu'Hanneman (médecin, Hambourg, Kiel) en 1677 a émis l'idée d'une malédiction divine. Cette question a été résolue par la découverte du mélanocyte par Sangiovanni en 1819 grâce aux premiers microscopes (Sangiovanni, 1819). Enfin, Du Shane a mis en évidence l'origine du mélanocyte en démontrant que les cellules des crêtes neurales peuvent donner naissance, entre autre, aux mélanocytes de la peau (Shane, 1934).

1. LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES MÉLANOCYTES DE LA PEAU

1.1. La première vague du développement des mélanocytes

1.1.1. Les cellules des crêtes neurales

1.1.1.a La formation des CCN

Les cellules des crêtes neurales (CCN) forment une population de cellules progénitrices multipotentes et transitoires, particulières aux vertébrés. Les précurseurs des CCN se trouvent en bordure de l'ectoderme neural (ou plaque neurale) à la frontière avec l'ectoderme non neural (fig.1A). Le neuroectoderme générera notamment le système nerveux central et l'ectoderme non neural formera l'épiderme. Chez le poulet et la souris, lors de la neurulation les bordures de la plaque neurale fusionnent pour former le tube neural (TN), tandis que chez le poisson zèbre, le TN est formé par endoneurulation : un cordon de cellules neurales s'invagine pour créer une cavité. Les CCN naissent à la jonction entre le tube neural et l'ectoderme non neural (fig.1A) (Le Douarin and Kalcheim, 1999; Gilbert, 2000; Knecht and

Bronner-Fraser, 2002). Une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permet aux CCN d'émerger du TN et de migrer dans l'embryon par vagues successives donnant naissance à différents lignages cellulaires (Duband, 2006, 2010). La distribution des différents dérivés des CCN dans l'embryon suit un schéma prédéterminé par la position des CCN le long de l'axe neural antéro-postérieur au moment de leur émergence du TN (fig.1B). Ainsi, les dérivés seront différents selon leur position initiale : céphalique (du mi-diencéphale au rhombomère 8), vagal (somites 1-7), troncal (somites 8-28) ou lombo-sacral (postérieur au somite 28). Les dérivés des CCN sont : les neurones et la glie du système nerveux sensoriel périphérique et autonome (ganglion parasympathique, entérique, sensoriel), les cellules neuroendocrines, les cellules de Schwann du système nerveux périphérique (ganglion sympathique), les cellules pigmentaires (mélanocytes), les os et le cartilage de la face (mésectoderme). Simultanément, les CCN du TN prolifèrent afin de maintenir une population cellulaire suffisante pour soutenir les délaminations successives des CCN (Le Douarin et al., 2004).

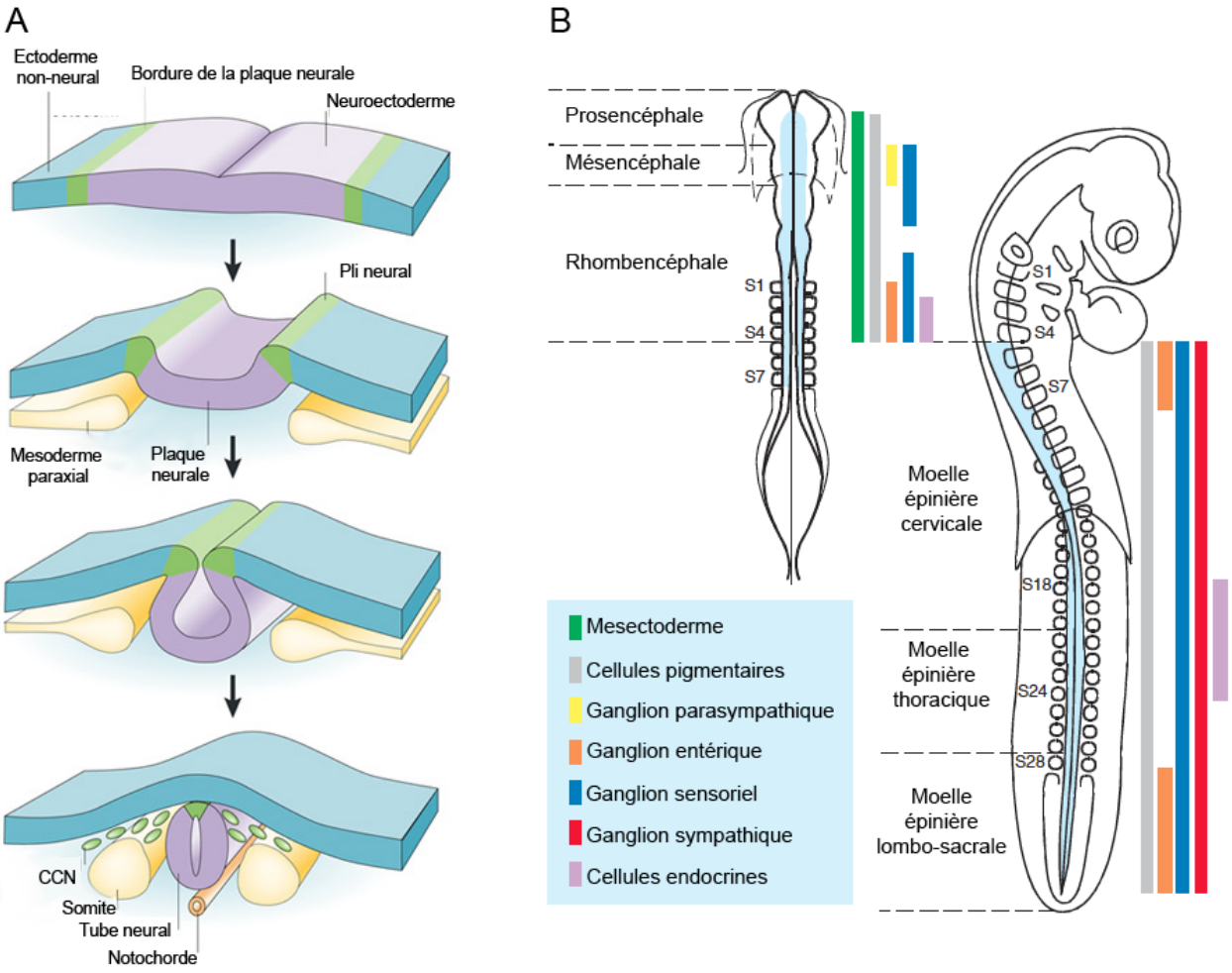


Figure 1 : Formation des CCN (A) et carte des différents dérivés des CCN le long de l'axe neural chez le poulet (B) *(adapté de Green et al., 2015; Le Douarin et al., 2004). (A) Les précurseurs des CCN se situent en bordure de la plaque neurale (vert), lors de la fermeture du TN, les CCN naissent à la jonction entre le tube neural (violet) et l'ectoderme de surface (bleu). Une fois le tube neural fermé, les CCN vont en émerger (vert) pour coloniser tout l'embryon. (B) Les CCN (bleu clair) donnent naissance à différents lignages et différentes*

structures ganglionnaires selon leur localisation dans l'embryon au niveau de l'axe antéro-postérieur : au niveau céphalique on distinguera le mésectoderme (vert), les ganglions parasympathique (jaune), les mélanocytes (gris) et les ganglions sensoriels (bleu). D'autres dérivés sont localisés au niveau troncal et lombo-sacral comme les mélanocytes (gris), les ganglions sensoriels (bleu), les ganglions sympathiques (rouge), les ganglions entériques (orange) et les cellules endocrines (violet).

1.1.1.b La spécification des CCN

La grande variété cellulaire des dérivés des CCN soulève la question des mécanismes impliqués dans le choix du destin cellulaire des CCN. Dans l'induction des CCN, quels sont les effets de facteurs intrinsèques de la détermination cellulaire et ceux des facteurs extrinsèques? Différentes théories ont été élaborées pour expliquer le choix du destin cellulaire des CCN. Dans la première théorie, les CCN sont déjà spécifiées et déterminées vers un lignage à l'intérieur du TN avant leur délamination (Harris and Erickson, 2007; Krispin et al., 2010; Nitzan et al., 2013a). Cette hypothèse de la spécification pré-migratoire implique que les CCN possèdent des propriétés intrinsèques spécifiques du lignage vers lequel elles sont déterminées, leur permettant de suivre des voies de migrations définies dans l'embryon. La seconde théorie défend l'idée que les CCN sont multipotentes**,** leur spécification ayant lieu plus tardivement (Bronner-Fraser and Fraser, 1988; Le Douarin and Dupin, 2003). Dans ce cas, les CCN acquièrent leur destin cellulaire pendant leur migration, sous l'effet de facteurs environnants et d'interactions avec différents types cellulaires. La colonisation finale d'un organe par les CCN aura lieu en fonction de la présence de facteurs spécifiques permettant leur survie et leur différenciation (Duband, 2006; Sandell and Trainor, 2006). Cette question de la spécification des CCN n'est pas complètement résolue, la diversité des modèles, des techniques ainsi que la difficulté de travailler sur une population transitoire et plastique, peut expliquer la divergence des observations. De nombreuses études clonales *in vitro* ont montré une hétérogénéité dans la population de CCN, avec l'existence simultanée d'environ 50% de progéniteurs multipotents et 50% de progéniteurs restreints à un lignage ou unipotents (Henion and Weston, 1997; Luo et al., 2003). Une récente étude *in vivo* utilisant le modèle murin R26R-Confetti, estime que 80% des CCN pré-migratoires (Wnt1 ::CreER^{T2}) et post-migratoires (Sox10 ::CreER^{T2}) du tronc sont multipotentes, tandis qu'une minorité est déterminée (Baggiolini et al., 2015; Bronner, 2015). Cette étude chez la souris étant réalisée au niveau troncal, il serait intéressant de regarder au niveau crânial, la zone contenant le plus de dérivés cellulaires différents. Ces deux études (Henion and Weston, 1997; Baggiolini et al., 2015) suggèrent ainsi une possible co-existence de ces deux théories (Dupin and Sommer, 2012). Les signaux rencontrés par les CCN au cours de leur migration et de la colonisation des tissus, pourraient agir de façon permissive et restrictive pour induire des dégrés variés de restriction du potentiel de différenciation (Douarin and Kalcheim, 1999).

Cette capacité des CCN à former de nombreux dérivés cellulaires au cours du développement embryonnaire, pose la question de la plasticité de ces dérivés chez l'adulte. Chez l'adulte, les dérivés des CCN forment une population cellulaire plastique et permissive aux signaux cellulaires rencontrés au cours de leur migration au stade embryonnaire (Dupin et al., 2003;

Motohashi et al., 2013; Motohashi and Kunisada, 2015). Il existe des exemples de dé-différenciation et de trans-différenciation de cellules embryonnaires ou adultes dérivant des CCN (Dupin et al., 2000; Tosh and Slack, 2002; Dupin et al., 2003). Chez l'embryon, des cellules déterminées en mélanoblastes Sox10+/Kit+ de la peau ou de l'oreille interne formeront *in vitro* des clones gliaux, neuronaux et des mélanocytes (Motohashi et al., 2013). Chez l'adulte, lorsque des cellules de Schwann provenant de nerfs sciatiques de poulet sont soumises à l'EDN3, elles peuvent se dé-différencier *in vitro* puis former des mélanocytes pigmentés (Dupin et al., 2003). Cette multipotence des CCN associée à la plasticité de certains de ses dérivés chez l'adulte, a donné naissance au terme « cellule souche des crêtes neurales » (Dupin et al., 2007; Achilleos and Trainor, 2012; Dupin and Sommer, 2012).

1.1.1.c Les voies de migrations des CCN

Les CCN suivent différentes voies de migrations au sein de l'embryon selon les dérivés cellulaires à générer (fig.2) (Serbedzija et al., 1990). Seules les parties troncales et vagales de l'embryon, correspondantes à notre étude, seront abordées dans ce chapitre. Les premières CCN à émerger du tube neural sont les précurseurs neuronaux-gliaux qui migrent dorsoventralement à travers l'embryon (fig.2) pour former les ganglions dorsaux (DRG), les ganglions sympatiques, les cellules gliales, les cellules de la coiffe et des mélanocytes. Les CCN qui émergent par la suite, suivent une deuxième voie de migration, la voie dorso-latérale entre l'ectoderme et les somites (fig.2). Les CCN migrant le long de cette voie forment uniquement des mélanocytes (Le Douarin and Kalcheim, 1999). Il existe des différences temporelles selon les espèces considérées. Chez la souris les CCN prennent ces deux voies de façon simultanées, tandis que chez le poulet et le poisson zèbre les CCN suivent la voie dorso-latérale plus tardivement : 1 jour plus tard pour le poulet et 4h plus tard pour le poisson zèbre (Theveneau and Mayor, 2012).

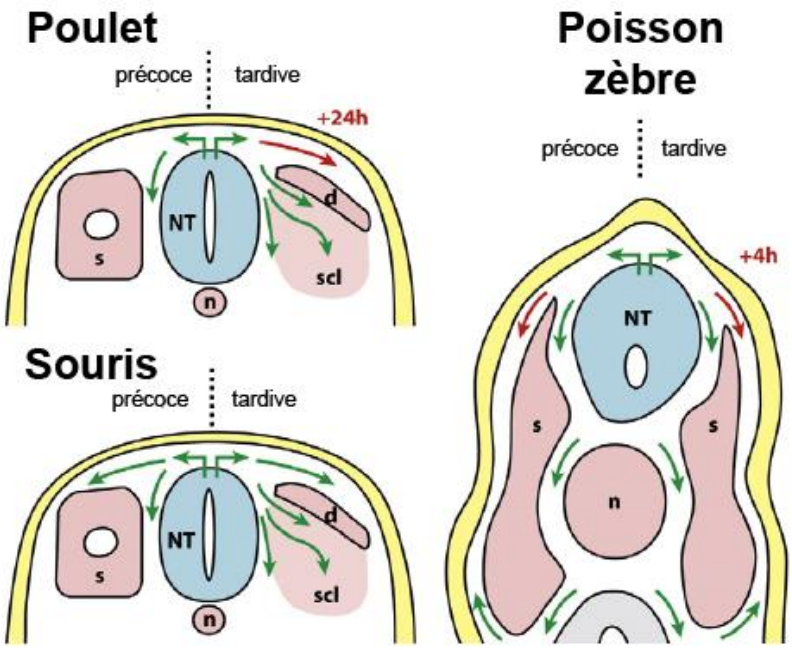


Figure 2 : Voies de migrations des CCN chez le poulet, le poisson zèbre et la souris *(adapté de Theveneau and Mayor, 2012). La gauche de l'embryon représente les voies de migrations précoces des CCN et la droite les voies de migrations tardives. Chez le poulet, la migration dorso-ventrale (vert) démarre entre le tube neural (NT) et les somites (S) puis se prolonge après la différenciation des somites. Les CCN migrent à travers le sclérotome (scl). La migration dorso-latérale (rouge) a lieu 24h après la migration dorso-ventrale. Chez la souris, la migration dorso-latérale et dorso-ventrale démarre en même temps (vert). Chez le poisson zèbre, la migration dorso-ventrale (vert) a lieu entre les somites et le tube neural puis entre les somites et la notochorde (n). La migration dorso-latérale (rouge) s'effectue 4h après la migration dorso-ventrale.*

1.1.2. Le développement des mélanocytes de la peau à partir des cellules des crêtes neurales

Ainsi, certaines CCN sont déterminées dans le TN avant leur émergence, tandis que d'autres CCN, multipotentes, sont spécifiées au cours de leur migration par différents facteurs environnementaux. Dans la littérature, les mélanoblastes sont toujours décris comme déterminés au moment de leur émergence du TN (Henion and Weston, 1997; Wilkie et al., 2002). Cette section se focalisera sur le développement des mélanoblastes dans les principaux modèles vertébrés (poulet, souris et poisson zèbre). Tous les stades du développement embryonnaire sont répertoriés en jour embryonnaire (E) pour toutes ces espèces. Chez le poulet, pour les études mentionnant les stades de Hamburger-Hamilton (HH), une conversion a été réalisée (Martinsen, 2005).

1.1.2.a Chez le poulet

Les mélanoblastes précurseurs du tronc migrent hors du tube neural entre le dermomyotome et l'ectoderme pour atteindre massivement l'épiderme entre E5 et E6. Les mélanoblastes migrent à travers le mésenchyme pour coloniser les bourgeons des ailes à partir de E3.5 et les bourgeons des pattes à partir de E4.5. Les mélanoblastes vont ensuite proliférer puis se différencier en mélanocytes spécifiquement au niveau de l'épiderme du bourgeon des plumes à partir de E9. Les mélanoblastes de cette zone seront les seuls à se différencier en mélanocytes pigmentés. Les autres mélanoblastes qui sont encore observés dans le derme à E11 deviennent des cellules souches pigmentaires responsables de la pigmentation des plumes, après la naissance et au cours de la vie adulte du poulet (Douarin and Kalcheim, 1999).

1.1.2.b Chez la souris

Chez la souris, les mélanoblastes précurseurs (MITF+, DCT- et KIT^{faible}) sont déterminés vers E8.5-E9.5 au niveau du tronc et s'engagent dans la MSA (migrating staging area), une zone pré-migratoire proche du TN (Opdecamp et al., 1997; Pla et al., 2001; Wilkie et al., 2002). Il a été montré grâce aux souris chimères que la colonisation de l'embryon s'effectue de manière clonale par des précurseurs situés de part et d'autre du TN. Ces souris chimères sont générées par le croisement de souris albinos avec des souris noires C57BL/6 et présentent un pelage rayé avec une alternance de zones blanches et de zones pigmentées (Mintz, 1967). Les souris albinos possèdent des mélanocytes non pigmentés tandis que les souris C57BL/6 ont des mélanocytes pigmentés. Chez les chimères, les zones blanches correspondent aux zones peuplées par des mélanoblastes descendant de précurseurs albinos tandis que les zones pigmentées sont des zones peuplées par la descendance de mélanoblastes wt formant des mélanocytes pigmentés. Ainsi, la présence d'un précurseur wt ou albinos conduit à la présence ou l'absence de pigmentation sur une zone dorso-latérale définie (Mintz, 1967). A partir de E10.5, les mélanoblastes précoces (MITF+, DCT+, KIT^{faible}) migrent dorso-latéralement à travers le derme entre l'ectoderme et la surface des somites (fig. 3) (Opdecamp et al., 1997; Pla et al., 2001; Wilkie et al., 2002). Les mélanoblastes tardifs (MITF+, DCT+ et KIT^{fort}) vont atteindre l'épiderme dès E11.5 (Opdecamp et al., 1997; Luciani et al., 2011). De E12.5 à E15.5 les mélanoblastes du derme et de l'épiderme prolifèrent activement. À E14.5, les temps de doublement des mélanoblastes de l'épiderme et du derme sont estimés respectivement à 18h et 28h. La prolifération des mélanoblastes du derme semble couplée à leur entrée dans l'épiderme. Ainsi, après chaque division d'un mélanoblaste, une des cellules filles va rejoindre l'épiderme tandis que l'autre reste dans le derme (Luciani et al., 2011). Par la suite, entre E15.5 et E16.5 les mélanoblastes vont se regrouper pour coloniser le follicule pileux en formation. Chez la souris, les mélanocytes du tronc sont localisés au niveau de la partie dorsale de la papille dermique dans la matrice du follicule pileux. Dans les zones avec peu ou pas de poils comme les pattes et la queue, des mélanocytes se trouvent également dans l'épiderme. La colonisation des pattes et de la queue par les mélanoblastes est plus tardive, mais aucune donnée précise n'a été publiée à ce jour.

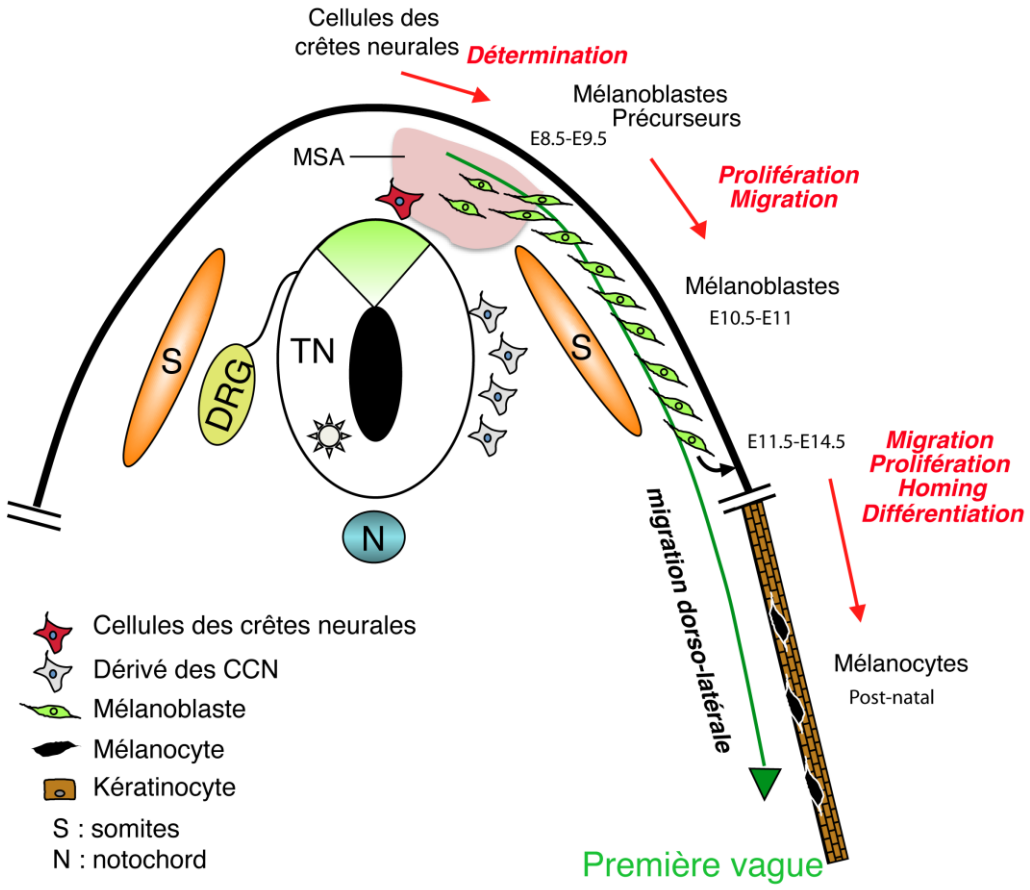


Figure 3 : Développement des mélanocytes depuis les CCN chez la souris (adapté de Bonaventure et al., 2013). *Les cellules des crêtes neurales (rouges) donnent naissance aux mélanoblastes précurseurs (vert) qui entrent dans la MSA (migrating staging area). Les mélanoblastes (vert) migrent dorso-latéralement (flèche verte) entre les somites (orange) et l'ectoderme (trait noir) pour atteindre la peau (brun) où ils se différencient en mélanocytes (noir).*

1.1.2.c Chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre est un modèle particulier puisqu'il possède trois types de cellules pigmentaires : les iridophores (pigment brillant), les xanthophores (pigment jaune) et les mélanophores (pigment noir), ces derniers correspondant aux mélanocytes chez les mammifères. Ces trois types de cellules pigmentaires dérivent des CCN et suivent trois voies de migration temporellement distinctes pour atteindre la peau (fig.4). Les premiers à émerger du TN sont les mélanoblastes et les iridoblastes, précurseurs respectivement des mélanophores et des iridophores. Les iridoblastes migrent selon une voie médiale (entre les somites et le tube neural) tandis que les mélanoblastes migrent selon des voies ventrales et latérales (fig.4). Enfin, les derniers à émerger du TN sont les xanthoblastes, précurseurs des xanthophores qui migrent selon une voie latérale (Kelsh, 2004; Kelsh et al., 2009). Une fois dans la peau les mélanoblastes forment des mélanophores, équivalents aux mélanocytes des mammifères. Cependant, le mécanisme de pigmentation des mélanophores est différent de

celui des mélanocytes. Chez les mammifères, les mélanocytes transfèrent leurs pigments aux cellules environnantes (cf. partie 2 de la présente introduction) tandis que chez le poisson zèbre les mélanophores conservent leurs pigments. Une propriété remarquable des mélanophores est la capacité de changer leur organisation cellulaire en s'agrégeant ou en se dispersant. Cela permet aux poissons de changer rapidement de couleur selon leur environnement (Logan et al., 2006).

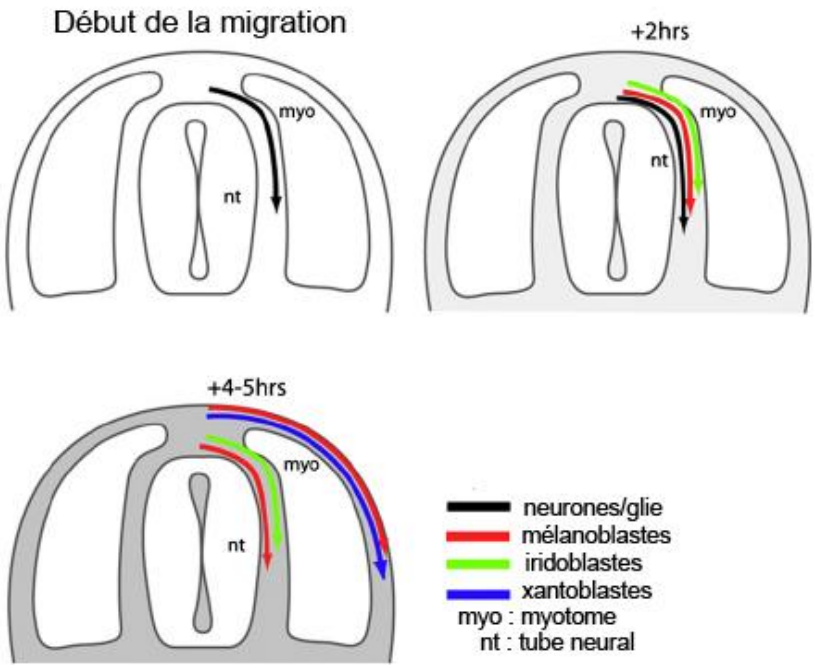


Figure 4 : Migration des cellules pigmentaires chez le poisson zèbre (adapté de Kelsh et al., 2009). *Les premiers dérivés des CCN à émerger du tube neural (TN) sont des précurseurs neuronaux et gliaux (noir) migrant dorso-ventralement dans l'embryon entre le myotome (myo) et le TN. Deux heures plus tard, les mélanoblastes (rouges) et les iridoblastes (vert) suivent aussi cette voie de migration. Entre 4h et 5h plus tard, tandis que les mélanoblastes (rouges) et les iridoblastes (vert) poursuivent leur migration dorso-ventrale, des mélanoblastes (rouge) et xantoblastes vont émerger du TN et migrer dorso-latéralement entre l'ectoderme et le myotome (myo).*

1.1.3 La détermination des mélanoblastes de la première vague

Le potentiel des CCN à former différents types cellulaires dépend de la présence de signaux moléculaires provenant de l'ectoderme et du mésoderme. Ces signaux sont responsables de l'activation de la transcription d'un réseau de gènes cibles déterminant le destin cellulaire des CCN (Pavan and Raible, 2012; Pegoraro and Monsoro-Burq, 2013; Mort et al., 2015). Ce sont les protéines MITF et KIT qui sont responsables de la détermination du destin mélanocytaire. Nous nous intéresserons tout d'abord aux facteurs extrinsèques ou intrinsèques induisant l'expression de *Mitf* et *Kit* puis aux rôles de ces protéines dans le lignage mélanocytaire

1.1.3.a Les facteurs de croissance : BMP4 et WNT

BMP-4 (bone-morphogenic protein 4) est un ligand des récepteurs de la famille TGF-β (transforming growth factor β). BMP-4 est produit par l'ectoderme (fig.5) et son antagoniste Noggin est produit par la notochorde. La présence de Noggin aboutit à la création d'un gradient de concentration de BMP-4 dans l'embryon. Une forte activité de BMP-4 définit un destin épidermique, une activité moyenne définit le destin des CCN et une faible activité definie un destin neurodermique (Baker and Bronner-Fraser, 1997; Knecht and Bronner-Fraser, 2002). Des signaux supplémentaires antagonisant l'effet de BMP-4, WNT ou FGF (fibroblast growth factor) et provenant du futur épiderme et/ou de la partie dorsale du TN et /ou du mésoderme paraxial sont nécessaires à l'induction des différents dérivés des CCN notamment des mélanoblastes (Jin et al., 2001; Knecht and Bronner-Fraser, 2002). BMP-4 est présent dans le TN au moment de la migration des précurseurs gliaux-neuronaux hors du tube. Il favorise la spécification des lignages gliaux et neuronaux au détriment du lignage mélanocytaire *in vitro* (Baker and Bronner-Fraser, 1997; Jin et al., 2001). Une étude récente a cependant montré que BMP-4 est capable d'activer la transcription de MITF dans les cellules ES et que l'addition de l'endothéline 3 (EDN3) permettait leur différenciation en mélanocytes matures (Yang et al., 2014). Une présence faible de BMP-4 pourrait être nécessaire à l'induction des mélanoblastes par les CCN, outre son rôle d'antagoniste.

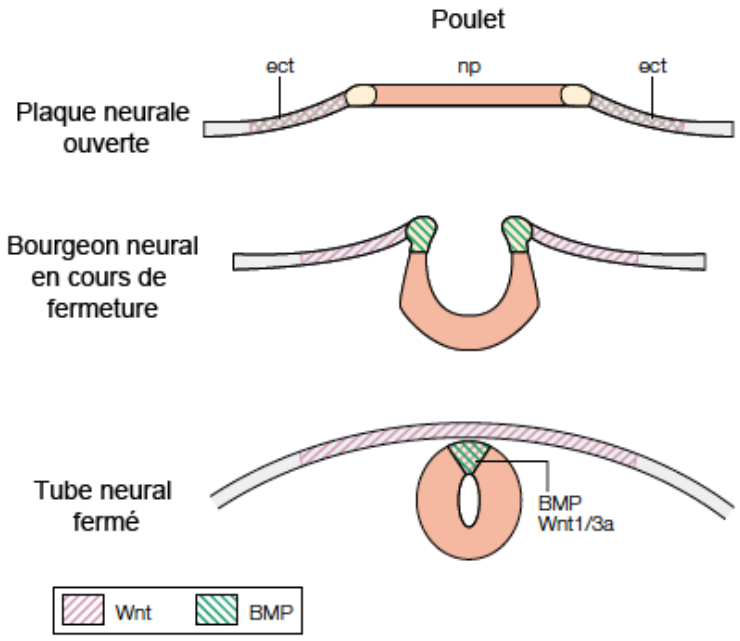


Figure 5 : Expression des facteurs de croissance Wnt et Bmp dans l'ectoderme du poulet au cours de la neurulation *(d'après Knecht and Bronner-Fraser, 2002). Wnt-6 (rouge) est exprimée à tous les stades de la neurulation dans l'ectoderme (ect) en revanche Bmp (rayures vertes) est exprimée de façon transitoire et faible dans l'ectoderme lorsque la plaque neurale (np) est ouverte. Lors de la fermeture du TN, l'expression de Bmp est diminuée au niveau de la plaque neurale mais augmentée dans les plis neuraux. Lorsque le TN est fermé, Bmp ainsi que Wnt1/3-a sont exprimés au niveau du TN.*

WNT-1 et WNT-3a sont des protéines de la famille WNT (Wingless-related integration site), antagonisant le signal BMP-4. Ces protéines sont présentes dans le TN au moment de la spécification des CCN (fig.5) (Bronner-Fraser, 2004). Les souris invalidées pour les ligands WNT-1 et WNT-3a (*Wnt1-null, Wnt-3a null*) sont dépourvues de plusieurs dérivés des CCN,

dont les mélanocytes (Ikeya et al., 1997). Lorsque *Wnt-1* est inhibé par siRNA on observe une différenciation préférentielle vers le lignage neuronal (Dorsky et al., 1998). L'ajout *in vitro* de WNT-3a stimule la différenciation des CCN vers le lignage mélanocytaire au détriment des lignages gliaux et neuronaux (Jin et al., 2001). Il a d'ailleurs été montré que WNT-3a induisait l'expression de *M-Mitf* (Takeda et al., 2000). Frizzled-3, l'un des récepteur des protéines WNT est exprimé par les CCN et les mélanoblastes en culture (Chang et al., 2014). Ainsi, les protéines WNT1, WNT-3a et leurs récepteurs Frizzled sont impliqués dans la spécification des CCN notamment en mélanoblastes par l'activation de *M-Mitf* (fig.6).

β-CATÉNINE est l'effecteur principal de la voie WNT canonique, son activation spatio-temporelle dans les CCN a un rôle dans la spécification de plusieurs dérivés des CCN (Dorsky et al., 1998; Hari et al., 2002; Clevers and Nusse, 2012). Chez la souris (cf. annexe1), la perte de *β-caténine* dans les CCN pré-migratoires (Wnt1 ::Cre ; βcatenin$^{flox/flox}$) ou dans les mélanoblastes (Tyr ::Cre ; Δbcat) induit une disparition totale des mélanoblastes (Hari et al., 2002; Luciani et al., 2011). Une activation précoce de la signalisation β-CATÉNINE dans les CCN pré-migratoires via l'utilisation d'un modèle murin stabilisant β-CATÉNINE dans le cytoplasme (Wnt1::Cre ; bcatΔex3) favorise le lignage neuronal sensoriel au détriment du lignage mélanocytaire (Hari et al., 2002). En revanche, une activation dans les CCN migratoires (Sox10::Cre ; bcatΔex3) favorise le lignage mélanocytaire, avec l'apparition de mélanocytes ectopiques dans les organes cibles des autres lignages, comme les ganglions sympathiques, la rate, le diaphragme ou encore le tractus urogénital (Danielian et al., 1998; Lee et al., 2004; Matsuoka et al., 2005; Hari et al., 2012). Cependant l'activation plus tardive, à partir de E12, de la signalisation de β-CATÉNINE (Dhh ::Cre ; bcatΔex3 ou PLP1 ::Cre ; bcatΔex3) dans des cellules dérivées des CCN localisées dorso-ventralement chez la souris (cf. annexe 1), n'a pas d'effet sur les mélanoblastes (Hari et al., 2012). β-CATÉNINE est capable d'activer la transcription de *M-Mitf* (fig.6) et d'interagir directement avec MITF pour activer ses cibles transcriptomiques (Widlund et al., 2002; Schepsky et al., 2006). β-CATÉNINE est donc un régulateur mais aussi un partenaire de MITF (fig.6).

1.1.3.b Les facteurs de transcription : PAX3 et SOX10

PAX3 (paired-box gene 3) est un facteur de transcription exprimé par les CCN dès E8,5 (Goulding et al., 1991). Ce facteur de transcription est capable d'activer la transcription de *M-Mitf* en coopération avec SOX10 (fig.6) (Bondurand et al., 2000; Potterf et al., 2000).

SOX10 est un facteur de transcription de la famille Sox (SRY-related high-mobility group box) exprimé par les CCN qui émergent du TN. Il est essentiel pour le développement de nombreux dérivés des CCN dont les mélanocytes et les cellules de Schwann (Southard-Smith et al., 1998; Kim et al., 2003; Saldana-Caboverde et al., 2015). SOX10 agit en coopération avec de nombreux autres facteurs de transcription tels PAX3, SOX2 ou FOXD3 afin de réguler l'expression des gènes au cours de la détermination des dérivés des CCN (Wahlbuhl et al., 2012). Dans les embryons de souris et de poisson zèbre invalidés pour *Sox10*, on observe

une disparition des cellules MITF+ et KIT+ (Dutton et al., 2001; Hou et al., 2006). SOX10 peut directement fixer les promoteurs de gènes essentiels pour les mélanoblastes comme *M-Mitf, Dct* et *tyrosinase*, afin d'en réguler la transcription (fig.6) (Potterf et al., 2001; Murisier et al., 2007; Wan et al., 2011).

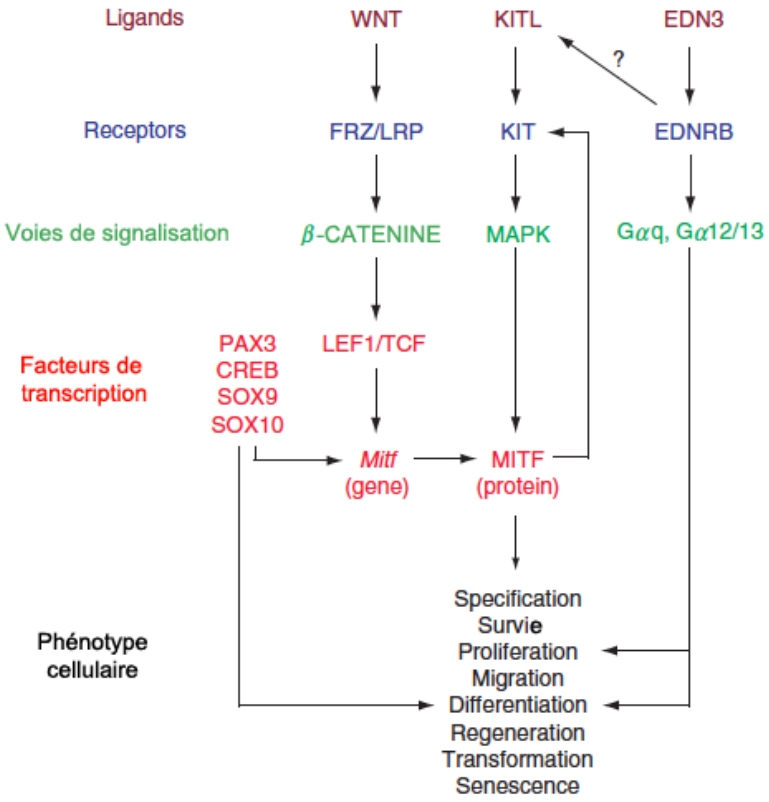


Figure 6 : Les protéines et les facteurs de transcription impliqués dans l'activation de M-Mitf *(adapté de Bismuth and Arnheiter 2007). Schéma des différents ligands (rouge foncé) activant les récepteurs (bleu) et voies de signalisations (vert) menant à la transcription de M-Mitf (rouge).*

1.1.3.c Les protéines du destin mélanocytaire : MITF et KIT

M-MITF (Microphthalmia associated transcription factor) est un facteur de transcription considéré comme le « gène maître » du lignage mélanocytaire (Goding, 2000). L'activation du gène *M-Mitf* au cours du développement des mélanocytes est une étape essentielle déterminant et fixant le destin mélanocytaire. L'isoforme M-MITF de ce gène va spécifiquement activer des gènes essentiels à la différenciation du mélanocyte, en particulier *Dct, tyrosinase, Trp1*, tout en inhibant des gènes exprimés par les CCN comme les facteurs de transcriptions *Sox9* (SRY-related high-mobility group box 9), *Snail2* et *Foxd3* (forkhead-box transcription factor D3) (Goding, 2000; Adameyko et al., 2012; Mort et al., 2015). Les souris mutantes $Mitf^{mi\text{-}ew}$ possèdent une mutation dans le domaine de liaison à l'ADN empêchant une activité transcriptionnelle efficace de cette protéine. L'étude de ces mutants montre que quelques rares mélanoblastes MITF positifs / KIT positifs sont produits par les CCN

(Nakayama et al., 1998). Cependant, ces mélanoblastes n'expriment pas d'autres marqueurs du lignage mélanocytaire comme DCT et disparaissent à E12.5, probablement par apoptose (Nakayama et al., 1998). L'expression ectopique de *M-Mitf* est capable de modifier le destin cellulaire des CCN chez le poisson zèbre en faveur des mélanocytes, ce qui montre que l'expression de *M-Mitf* est suffisante pour établir un destin mélanocytaire (Lister et al., 1999).

KIT est un récepteur tyrosine kinase considéré comme l'un des marqueurs précoces du lignage mélanocytaire. Il est exprimé en même temps que *M-Mitf*, dès le stade des mélanoblastes précurseurs émergeant du TN (Opdecamp et al., 1997; Wehrle-Haller, 2003). Chez le poulet, lorsque des cellules KIT+ provenant des CCN sont mises en culture, elles forment uniquement et invariablement des clones de mélanocytes (Luo et al., 2003). KIT ligand (KIT-L) le ligand du récepteur KIT, est un facteur de croissance produit par le dermatome au niveau dorsal (Wehrle-Haller, 2003).

KIT et MITF se co-régulent, MITF est nécessaire à la maintenance de l'expression de *Kit* dans les mélanoblastes (fig.6) (Opdecamp et al., 1997). L'activation de la signalisation KIT par KITL dans des mélanocytes et cellules de mélanomes humains *in vitro*, induit soit la dégradation de MITF par le protéasome, soit son activation en induisant sa phosphorylation par ERK1/2 et RSK1 (Ribosomal protein S6 kinase 1) (Wu et al., 2000). Les détails et les circonstances du déclenchement d'une dégradation protéolytique ou d'une activation transcriptomique de *Mitf* par la signalisation KIT ne sont pas connus. Ainsi, MITF et KIT seraient les premiers marqueurs de la détermination du lignage mélanocytaire. Ensuite *Dct* sera exprimé au cours de la différenciation du mélanoblaste (Opdecamp et al., 1997).

1.1.4. Les protéines de la migration, de la prolifération et de la survie des mélanoblastes

1.1.4.a MITF, KIT et DCT

MITF est impliqué dans la détermination mais aussi dans la survie, la prolifération et la différenciation des mélanoblastes ainsi que dans la pigmentation du mélanocyte adulte (Opdecamp et al., 1997; Hou et al., 2000; Goding, 2000). L'activation des nombreux gènes cibles de MITF dépend de son hétérodimérisation avec d'autres membres de sa famille comme TFEB, TFEC ou TFE3 (transcription factor EB, EC ou E3) ou de sa dimérisation avec d'autres protéines comme β-CATÉNINE (Goding, 2000). L'absence ou la mutation de *Mitf* induit très souvent la perte totale des mélanocytes dans plusieurs espèces (Hodgkinson et al., 1993; Lister et al., 1999).

KIT est un récepteur tyrosine kinase dont l'expression augmente au cours du développement des mélanoblastes. Il est exprimé faiblement par les mélanoblastes précurseurs puis fortement par les mélanoblastes tardifs et les mélanocytes (Opdecamp et al., 1997). Son activation par son ligand KIT-L est essentielle à la migration, la survie, la prolifération et la différenciation

des mélanoblastes aussi bien que des mélanocytes, cela chez la souris, le poulet et le poisson zèbre (Mackenzie et al., 1997; Jordan and Jackson, 2000a; Aoki et al., 2015). Chez la souris, malgré la perte de l'expression de *Kit* due à l'insertion d'un transgène ($Kit^{W\text{-}LacZ/W\text{-}LacZ}$), on observe des cellules MITF+ migrant hors du TN (Hou et al., 2000). Cependant, ces cellules meurent rapidement au cours du développement. Cette perte de KIT peut toutefois être compensée par l'ajout *in vitro* d'endothéline-1 ou 3 permettant la survie de ces cellules, ce qui suggère un *cross-talk* entre ces deux voies de signalisation au cours de la différenciation du mélanoblaste (fig.6) (Hou et al., 2000). Des injections d'anticorps monoclonaux anti-KIT (ACK2) à partir de E13.5, bloquant la fonction de KIT, induisent ou non un phénotype pigmentaire dans la descendance, selon le temps embryonnaire d'injection (Nishikawa et al., 1991). Cette dernière étude montre que la fonction de KIT est requise vers E14.5 pour l'entrée des mélanoblastes dans l'épiderme, de même qu'au niveau post-natal pour le maintien de la pigmentation des poils. D'autres études ont complété ces observations, montrant que KIT est impliqué dans la migration des mélanoblastes dans le follicule pileux et dans l'épiderme (Kunisada et al., 1998; Jordan and Jackson, 2000a). L'expression exogène du ligand de KIT, KIT-L, dans les kératinocytes *in vivo* chez la souris, induit la présence de mélanoblastes dans des zones épidermiques normalement dépourvues de mélanocytes (Kunisada et al., 1998). Ainsi, KIT semble être requis de manière périodique à différentes étapes du développement des mélanoblastes et des fonctions du mélanocyte (Nishikawa et al., 1991; Kunisada et al., 1998; Luo et al., 2003).

DCT, précédemment nommée TRP2, est une enzyme impliquée dans la pigmentation du mélanocyte (cf partie II de la présente introduction). Elle est exprimée par les mélanoblastes précoces. Son expression est stimulée par les endothélines 1, 2 et 3 (Opdecamp et al., 1998). Les mélanoblastes provenant de mutants murins de *Mitf* ($Mitf^{ew}$) n'expriment pas *Dct* (Nakayama et al., 1998). Cette dernière étude montre que la présence de MITF est nécessaire, de manière directe ou indirecte, pour l'expression de *Dct* dans les mélanoblastes.

1.1.4.b β-CATÉNINE

La modulation de la quantité de β-CATÉNINE dans le noyau des mélanoblastes induit une prolifération plus ou moins importante de ces cellules et une pigmentation variable des souris (Luciani et al., 2011). Les souris C57BL/6 wt sont noires, celles n'exprimant plus *β-caténine* (Tyr ::Cre ; Δbcat) sont blanches et les souris ayant une augmentation légère de la quantité β-CATÉNINE dans le noyau (Tyr ::Cre ; $bcat^{sta}$) sont grises. Le rôle de β-CATÉNINE sur les mélanoblastes est donc dose-dépendant. Cette protéine est aussi directement impliquée dans la migration dorso-latérale des mélanoblastes (Larue et al., 2003; Gallagher et al., 2013). Dans les mélanocytes, β-CATÉNINE régule la production de pigments par son action directe sur la transcription de *M-Mitf* (Widlund et al., 2002; Cho et al., 2009).

1.1.4.c EDNRB et les endothélines

EDNRB (Endotheline Receptor B) est un récepteur couplé aux protéines G, exprimé par les CCN entre E10.5 et E12.5 (Shin et al., 1999; Lee et al., 2003). L'absence de EDNRB (ERNRB-null) induit la perte des mélanoblastes peu de temps après leur production vers E11.5, les mélanoblastes changent de destin cellulaire et disparaissent, les souris sont blanches (Shin et al., 1999; Lee et al., 2003). Des études complémentaires ont montré que EDNRB est impliqué dans la migration dorso-latérale, la prolifération et la différenciation des mélanoblastes (Opdecamp et al., 1998; Lee et al., 2003). Les mélanoblastes MITF+/DCT+ issus des mutants EDNRB-null, qui ne peuvent maintenir un destin mélanocytaire dans l'embryon, sont capables de se différentier en mélanocyte *in vitro* en présence de KITL (Hou et al., 2004). Il semble que la signalisation EDNRB et KIT soit liée au cours des étapes précoces du développement des mélanoblastes (fig.6). Les ligands de EDNRB sont les endothélines. Les endothélines 1, 2 et 3 favorisent la prolifération des mélanoblastes et leur différenciation en induisant notamment l'expression de *Dct* et *tyrosinase* ainsi que la synthèse de KITL (Opdecamp et al., 1998; Hou et al., 2004). L'endothéline-3 (EDN3) qui est exprimée par l'ectoderme et le dermomyotome, pourrait diriger la migration dorso-latérale des mélanoblastes (Lee et al., 2003; Pla et al., 2005; Krispin et al., 2010).

1.1.4.d PAX3

Outre son rôle dans la spécification des mélanoblastes, PAX3 est aussi nécessaire à leur migration et leur expansion dans l'embryon (Hornyak et al., 2001). En coopération avec SOX10, PAX3 est capable d'activer *M-Mitf* et de réprimer *Dct*, permettant la régulation temporelle de la prolifération des mélanoblastes (Lang et al., 2005; Potterf et al., 2000). En réprimant l'expression de *Dct*, PAX3 permet la croissance de la population des mélanoblastes. La levée de cette répression induit la différenciation des mélanoblastes. Il semblerait que PAX3 ait aussi un rôle dans l'expansion des précurseurs avant leur différenciation dans d'autres types cellulaires comme les cellules de Schwann immatures (Van Raamsdonk and Deo, 2013). Chez les souris adultes, PAX3 aurait un rôle dans la différenciation des cellules souches mélanocytaires du follicule pileux (Osawa et al., 2005).

1.1.4.e Les protéines de la migration : RAC1, P-REX1, FASCIN-1

Les mélanoblastes migrent dans le derme pour atteindre l'épiderme, cette migration s'effectue par la formation de protrusions de types pseudopodes (Li et al., 2011). RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) est une protéine du cytosquelette ayant un rôle majeur dans ce type de migration. Chez la souris, une perte de *Rac1* dans les mélanoblastes induit des défauts de migration associés à des troubles du cycle cellulaire conduisant à l'apparition de zones dépigmentées (Li et al., 2011). D'autres mutants des protéines de la migration cellulaire comme la FASCIN-1 ou P-REX1 affectent aussi la migration et la prolifération des mélanoblastes, induisant des dépigmentations légères très localisées (ventre blanc) (Lindsay

et al., 2011; Ma et al., 2013). Ce phénotype est assez faible, compte tenu du rôle majeur de ces protéines dans la migration cellulaire et suggère l'existence d'autres protéines impliquées dans cette migration (Mort et al., 2015).

1.1.5. La voie de signalisation WNT canonique

Les protéines WNT sont des protéines glycosylées sécrétées agissant de manière autocrine ou paracrine. Il existe 19 gènes *Wnt* chez l'homme et la souris (Papkoff and Schryver, 1990). Il y a trois cascades de signalisation possibles selon la protéine WNT présente pour activer son récepteur : la voie WNT canonique, la voie non canonique calcique et la voie non canonique *planar cell polarity*. Seule la voie canonique sera décrite dans ce paragraphe, car ce sera la seule voie de signalisation WNT étudiée au cours de ce projet. Les protéines WNT fixent et activent les récepteurs FRIZZLED (FZD) qui se dimérisent avec leurs co-récepteurs LRP5/6 (fig. 7). Cette dimérisation de FZD et LRP va induire la phosphorylation de Disheveled (Dvl ou Dsh) et le recrutement d'AXINE par les LRP. On observe alors la dissociation du complexe protéique séquestrant β-CATÉNINE dans le cytoplasme en absence de signal WNT: GSK3β (glycogen synthase β), APC (adenomatosis polyposis coli), AXINE, CK1 (Casein Kinase 1), WTX (X-linked intracellular inhibitor of Wnt / b-catenin signaling) et β-CATÉNINE. Cette dissociation permet la libération de β-CATÉNINE dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau où elle pourra se lier avec les facteurs de transcriptions de la famille LEF/TCF (Lymphoïd enhancer factor et T-cell factor) pour agir comme co-facteur de transcription. L'interaction avec les protéines LEF/TCF de β-CATÉNINE va permettre le recrutement de protéines favorisant l'ouverture de la chromatine comme BCL-9 (B-cell CLL/lymphoma 9). La fixation de ce complexe sur l'ADN permet d'activer un certain nombre des gènes cibles de la voie WNT selon la quantité de β-CATÉNINE présente dans le noyau. Environ une centaine de cibles directes ou indirectes de β-CATÉNINE ont été mises en évidence, ces gènes sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires comme la motilité, l'homéostase, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose (Clevers and Nusse, 2012; Jansson et al., 2015).

En revanche, lorsque le ligand WNT n'est pas présent pour activer FZD, β-CATÉNINE est piégée dans un complexe protéique avec : GSK3β, APC, CK1, WTX et axine (fig 7). Les kinases CK1 et GSK3β vont phosphoryler les résidus serines et thréonines de β-CATÉNINE en cascade. Ces phosphorylations seront reconnues comme un signal de dégradation, β-CATÉNINE sera ubiquitinée par le complexe d'ubiquitination E3 ligase et adressée au protéasome pour être dégradée. Ce complexe de dégradation a pour fonction d'empêcher la disponibilité de β-CATÉNINE pour l'activation de ces gènes cibles. En l'absence de β-CATÉNINE, les facteurs de transcription LEF/TCF intéragissent avec les répresseurs transcriptionnels GROUCHO, la voie de signalisation WNT/β-CATÉNINE est inactive (Clevers and Nusse, 2012; Jansson et al., 2015).

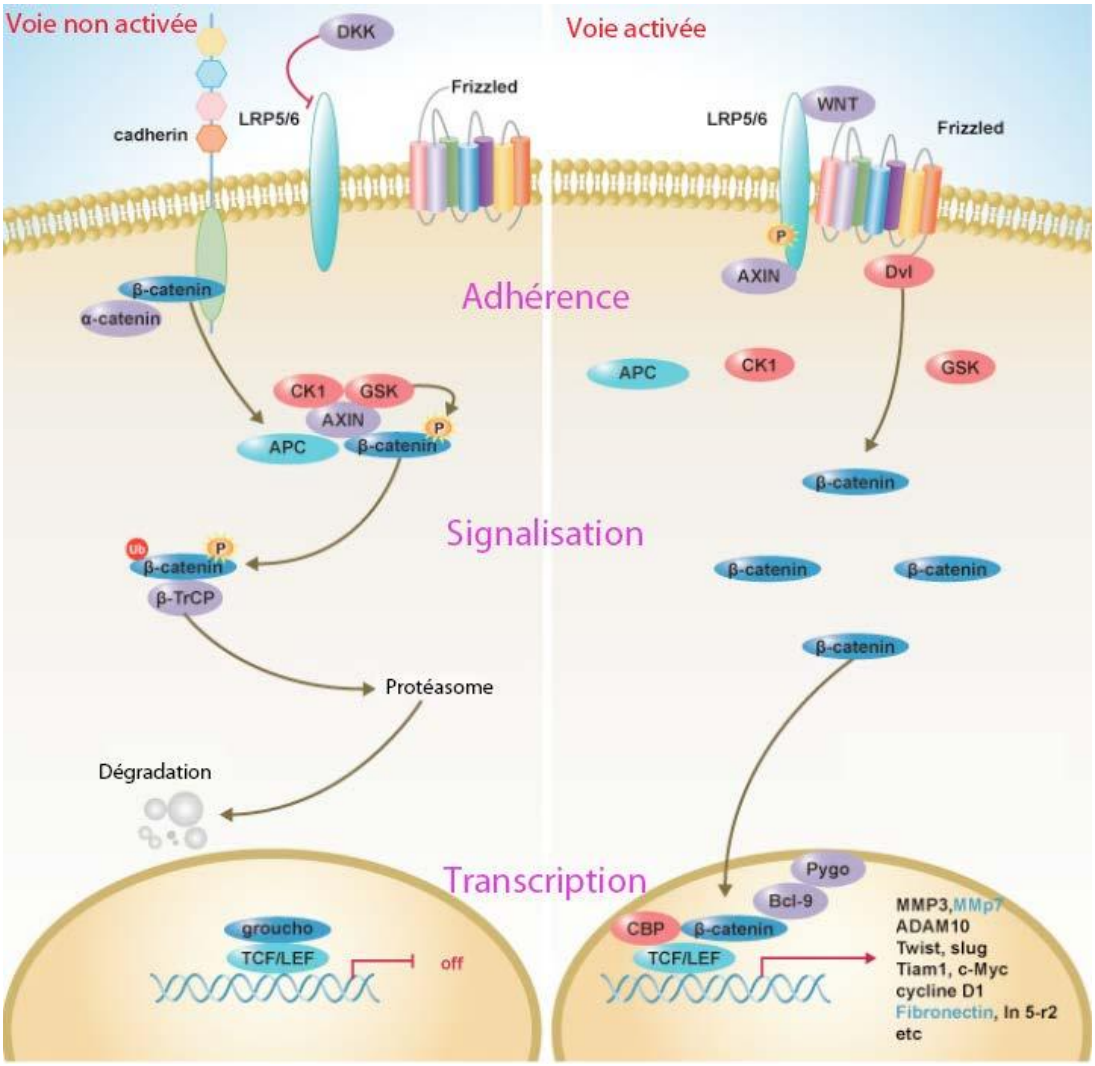


Figure 7: La voie de signalisation WNT canonique *(adapté de http://old.sinobiological .com). Voie non activée : en l'absence de ligand WNT, β-CATÉNINE est piégée dans un complexe de dégradation comprenant les protéines APC, AXINE, DSH, CK1 et GSK3β. Ce complexe va induire sa phosphorylation et son adressage au protéasome pour dégradation. β-CATÉNINE peut également être présente à la membrane, au niveau des jonctions adhérentes de la cellule. Ainsi β-CATÉNINE ne pourra pas activer ses gènes cibles. Voie activée : en présence de WNT, le récepteur FRIZZLED se dimérise avec son co-récepteur LRP induisant la phosphorylation de DSH. DSH va induire la dissociation du complexe APC, AXINE, CK1, β-CATÉNINE et GSK3β. β-CATÉNINE libérée dans le cytoplasme sera transloquée dans le noyau où elle s'associe avec les facteurs de transcription LEF/TCF pour activer ses gènes cibles.*

Dans la cellule, β-CATÉNINE est aussi localisée à la membrane cellulaire, au niveau des jonctions adhérentes (fig. 7). Une déstabilisation du complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE est observée après une phosphorylation par la kinase Src lors d'un stress oxydatif (Owens et al., 2000; Chan et al., 2010). La mobilisation du pool de β-CATÉNINE membranaire est aussi un mécanisme permettant l'augmentation de β-CATÉNINE cytoplasmique et l'activation de la voie WNT (Heuberger and Birchmeier, 2010). Il y a trois localisations possibles de β-CATÉNINE dans la cellule : cytoplasmique, nucléaire et membranaire. La cellule

dispose donc de plusieurs mécanismes pour induire différents niveaux d'activation de cette voie. Le récepteur FZD7 est d'ailleurs un partenaire du complexe jonctionnel dans les cellules endothéliales, couplant ainsi adhésion et signalisation (Ferreira Tojais et al., 2014). Cette régulation très fine de la quantité de β-CATÉNINE, explique que selon le niveau d'activation exercé artificiellement sur cette voie et selon la fenêtre temporelle choisie, on peut observer des résultats parfois contradictoires dans la littérature scientifique. Les souris ayant une augmentation légère de β-CATÉNINE dans le noyau (Tyr ::Cre ; $bcat^{sta}$) ont un pelage gris tandis que celles ayant une forte augmentation de β-CATÉNINE dans le noyau (Tyr ::Cre ; bcatΔex3) n'ont pas de différence de couleur du pelage (Luciani et al., 2011; observations non publiées).

1.2. La deuxième vague du développement des mélanocytes

Il a récemment été montré que des mélanoblastes peuvent se développer à partir des cellules précurseurs de Schwann (SCP) migrant dorso-ventralement dans l'embryon (Adameyko et al., 2009). Cette partie 1.2 s'intéressera au développement des cellules de Schwann puis à celui des mélanoblastes dérivant des SCP.

1.2.1. Le développement des cellules de Schwann chez la souris

1.2.1.a Les cellules précurseurs de Schwann

Les premières CCN à émerger du tube neural sont des précurseurs neuronaux-gliaux migrant dorso-ventralement à E10-E11 (Henion-Weston 1997). Les précurseurs neuronaux-gliaux donnent naissance aux précurseurs de neurones et aux cellules précurseurs de Schwann (SCP), une population de cellules transitoires formant principalement des cellules gliales (Jessen et al., 1994). Parmi les cellules gliales, on distingue les oligodendrocytes du système nerveux central (SNC) dérivant du neuroépithélium et les cellules de Schwann du système nerveux périphérique (SNP) dérivant des CCN (Ndubaku and de Bellard, 2008). Seul le développement des cellules gliales du système nerveux périphérique au niveau troncal et lombo-sacral sera décrit puisqu'elles dérivent des CCN et qu'elles ont un précurseur commun avec les mélanoblastes. Les axones des précurseurs de neurones croissent ventralement depuis le TN pour coloniser les différents organes de l'embryon (cf. I.I). Les SCP s'associent étroitement aux axones des neurones ayant déjà migrés afin de favoriser la conduction nerveuse et forment ainsi des nerfs embryonnaires. Les nerfs embryonnaires sont considérés comme des niches pour les SCP, qui sont complètement dépendants des facteurs trophiques produits par les neurones pour leur survie. Cette dépendance aux facteurs trophiques produits par les nerfs est perdue lors de leur différenciation. Ensuite, les SCP migrent le long des axones des futurs nerfs afin de coloniser les parties distales de l'embryon, et se différencient en cellule de Schwann immatures (Dong et al., 1995; Mirsky et al., 2002; Jessen and Mirsky, 2005; Woodhoo and Sommer, 2008). Au cours de leur différenciation, les SCP, puis les cellules de

Schwann, expriment différentes protéines comme BFABP, une protéine exprimée dès le stade SCP (fig. 8) (Jessen and Mirsky, 2005; Boneva et al., 2011).

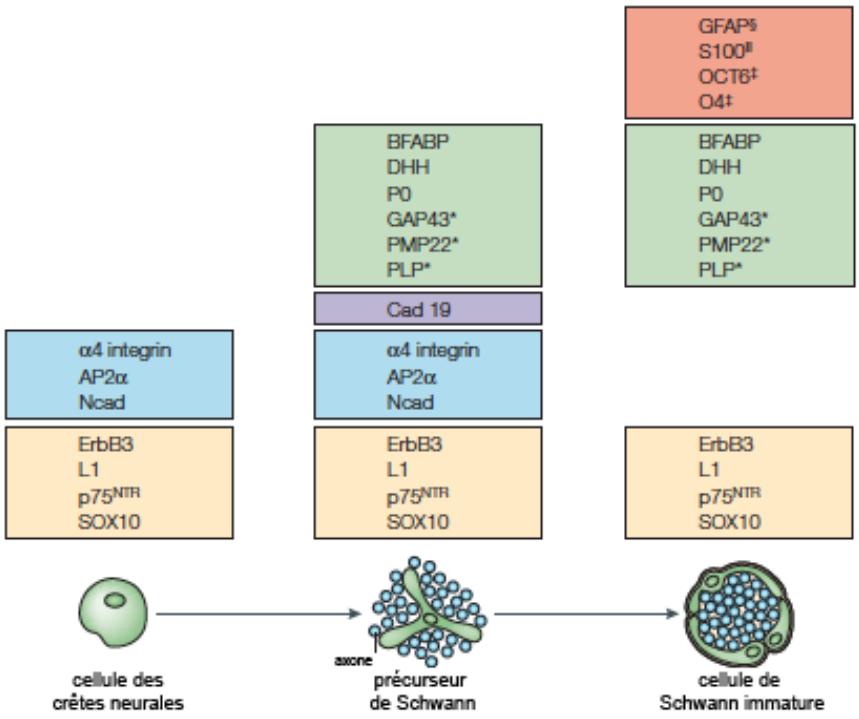


Figure 8 : Protéines exprimées durant la différenciation des cellules de Schwann (Adapté de Jessen and Mirsky, 2005). *Liste des protéines exprimées à chacun des stades du développement des cellules de Schwann et considérées comme des marqueurs cellulaires de ces stades. Les cellules des crêtes neurales et ses dérivés expriment les protéines listées dans le cadre jaune. Les protéines listées dans le cadre bleu seront exprimées par les CCN et les SCP. La cadhérine 19 (cadre violet) est le seul marqueur du stade SCP seul. Les protéines exprimées à partir du stade SCP et par les cellules de Schwann immatures sont listées dans le cadre vert et enfin les protéines exprimées par les cellules de Schwann immatures sont notées dans le cadre orange.*

1.1.3.b La différenciation des SCP en cellules de Schwann

Les SCP apparaissent vers E12-13 au niveau troncal chez la souris, migrent le long des nerfs embryonnaires puis se différencient en cellules de Schwann immatures entre E13-E15 (fig. 9) (Jessen and Mirsky, 2005). Les cellules de Schwann immatures participent à la régulation de la prolifération et du calibre des axones des neurones (Mirsky et al., 2002). Après la naissance, les cellules de Schwann immatures prolifèrent et se différencient en cellules de Schwann non myélinisantes ou pro-myélinisantes selon la taille de l'axone avec lequel elles s'associent de façon aléatoire (Woodhoo and Sommer, 2008). Le rôle principal des cellules de Schwann est de créer une couche protectrice autour des axones des neurones qui sera différente selon le diamètre de l'axone. Les cellules de Schwann non myélinisantes organisent plusieurs petits axones tout en maintenant les axones séparés les uns des autres par une fine extension de leur corps cellulaire, tandis que les cellules de Schwann myélinisantes vont créer

une gaine de myéline autour des axones de large diamètre (minimum 1µm), c'est-à-dire tous les neurones moteurs et quelques neurones sensitifs (Corfas et al., 2004; Jessen and Mirsky, 2005; Kaplan et al., 2009). La gaine de myéline a une fonction de protection mais surtout elle favorise l'influx nerveux depuis le cerveau jusqu'à la périphérie de l'organisme permettant une communication rapide entre le CNS et le reste du corps (Ndubaku and de Bellard, 2008). Au cours du processus de myélinisation, une seule cellule de Schwann va s'associer avec un seul axone, c'est une relation 1:1 (Sherman and Brophy, 2005). La membrane de la cellule de Schwann myélinisantes va progressivement entourer l'axone de plusieurs couches successives afin de former une gaine de myéline. Le processus de myélinisation dépend de l'expression par la cellule de Schwann d'un certain nombre de protéines telles que : MBP (myelin basic protein), PMP22 (peripheral myelin protein 22) ou encore MAG (myelin-associated glycoprotein). La myélinisation dépend aussi de la présence de facteurs sécrétés par les neurones et la matrice extracellulaire (Nave and Schwab, 2005; Grigoryan et al., 2013).

Chez l'adulte, les cellules de Schwann s'associent aussi avec les fibres nerveuses sensitives dont les terminaisons nerveuses se trouvent au niveau de la peau. Ces fibres sensitives (mécanorécepteurs, thermo-récepteurs et récepteurs à la douleur) provenant des DRG, traversent la jonction derme-épiderme pour innerver certaines cellules de l'épiderme (Boulais and Misery, 2008).

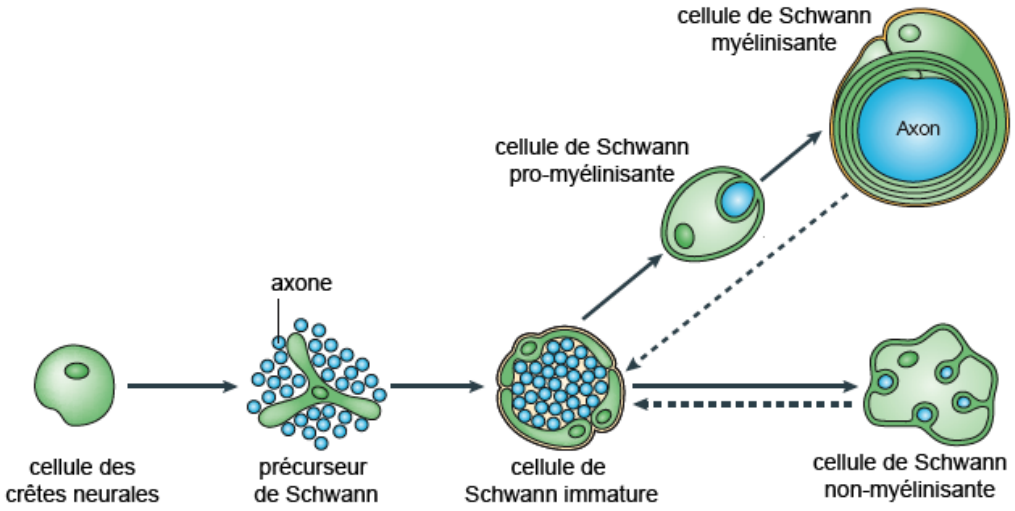


Figure 9 : Différenciation des cellules de Schwann *(Adapté de Jessen and Mirsky, 2005). Les cellules des crêtes neurales vont donner naissance aux cellules précurseurs de Schwann immatures qui vont s'associer aux axones des neurones (bleu). Les précurseurs de Schwann vont se différencier (flèches noires pleines) en cellule de Schwann immatures entourant les axones des neurones et formant des nerfs embryonnaires. Après la naissance, ces cellules de Schwann immatures vont se différencier soit en cellule de Schwann non–myélinisantes entourant plusieurs petits axones soit en cellule de Schwann pro-myélinisantes entourant un gros axone. Ces dernières se différencient en cellule de Schwann myélinisantes. La dé-différenciation (flèche noire pointillée) est possible chez l'adulte au cours de blessures.*

1.1.3.c La formation et l'organisation du nerf chez l'adulte

Les nerfs embryonnaires sont composés uniquement d'axones associés étroitement avec des SCP qui se différencient en cellules de Schwann immatures. Les nerfs embryonnaires s'associent avec les vaisseaux sanguins de leur organe cible. Les cellules de Schwann immatures vont produire des signaux, comme la protéine Desert Hedgehog, qui induisent la formation du mesenchyme entourant le nerf adulte, à partir de E15-E16 chez la souris (Parmantier et al., 1999). Au cours de leur maturation, les nerfs sont progressivement recouverts par du mesenchyme formant une gaine de tissu connectif dont le rôle est de protéger et maintenir la cohésion des fibres nerveuses et des axones (fig.10). Ce tissu connectif contient différents types cellulaires et se compose de trois couches successives, décrites de l'extérieur vers l'intérieur (Jessen and Mirsky, 2005; Kaplan et al., 2009):

- l'épineurium : partie la plus externe recouvrant les nerfs, composée de nombreuses fibres de collagène et de quelques cellules adipeuses,
- le périneurium : partie médiane contenant les vaisseaux sanguins et organisant les fascicules. Il est composé de cellules périneuriales très cohésives présentant un phénotype de type épithélial (epithelial-like),
- l'endoneurium : il forme les fascicules contenant axones et cellules de Schwann et se compose de fibroblastes produisant des fibres de collagènes et de la matrice extracellulaire.

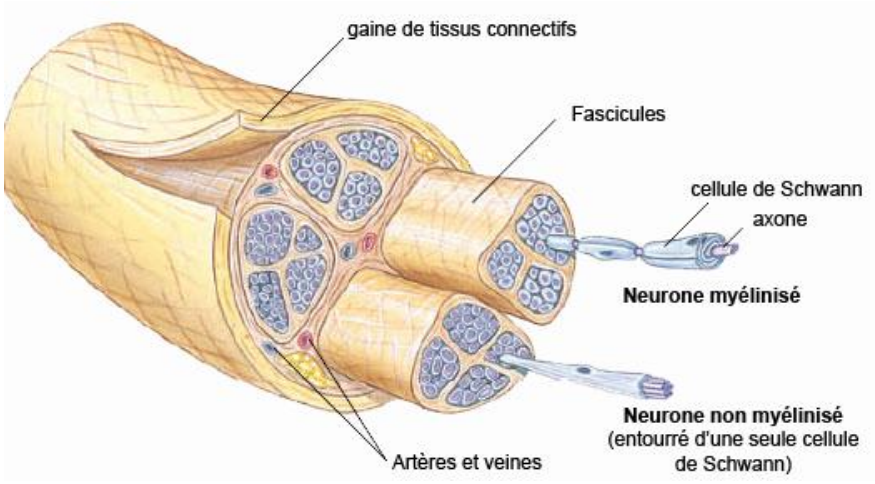


Figure 10: Composition d'un nerf adulte *(d'après https://universe-review.ca). Les nerfs sont composés d'une gaine de tissus connectifs (jaunes) qui contient des fascicules ainsi que des artères et des veines. Chaque fascicule contient des cellules de Schwann entourant les axones des neurones. Les cellules de Schwann peuvent être myélinisantes ou non.*

L'origine embryonnaire des cellules composant le nerf est multiple et complexe : les vaisseaux sanguins dérivent du mésoderme tandis que d'autres cellules dérivent des CCN (neurones, cellules de Schwann et fibroblastes). L'hypothèse actuelle est que ces fibroblastes du tissu connectif, dérivent des SCP au cours de la transition SCP vers cellules de Schwann

immatures (Joseph et al., 2004). Concernant les cellules périneuriales, un doute subsiste quant à leur origine : des CCN ou du mésoderme (Kaplan et al., 2009).

1.2.2. Le développement des mélanocytes depuis les cellules précurseurs de Schwann

1.2.2.a La découverte d'une seconde vague de mélanoblastes

Une étude a récemment mis en évidence que les mélanoblastes peuvent dériver des SCP migrant dorso-ventralement chez la souris et le poulet *in vivo* (Adameyko et al., 2009). Cette seconde vague de mélanoblastes est distincte temporellement, puisque plus tardive, et spatialement car migrante dorso-ventralement (fig.11). Elle a été mise en évidence chez la souris et le poulet au niveau du tronc (Adameyko et al., 2009) puis chez le poisson zèbre (Budi et al., 2011). Cependant, l'existence d'un précurseur commun au lignage glial et mélanocytaire est soupçonnée depuis 1977 : les DRG extraits uniquement entre E4 et E6 du poulet, peuvent former des mélanocytes et des cellules de Schwann *in vitro* (Nichols and Weston, 1977). D'autres études *in vitro* ont également mis en évidence l'existence de ces précurseurs bipotents (Bronner-Fraser and Fraser, 1988; Le Douarin and Kalcheim, 1999; Dupin et al., 2007).

L'existence d'une source de mélanoblastes autre que la voie dorso-latérale avait été suggérée par d'autres observations. Les mélanoblastes apparaissent au niveau des membres sans une migration apparente (Fox, 1949). Chez des souris exprimant une cassette LacZ sous promoteur DCT (Dct ::LacZ), il y a une coloration des fibres nerveuses, suggérant la présence de cellules DCT+ sur les nerfs des pattes arrières et de la queue (Mackenzie et al., 1997). L'existence de cette seconde vague a été proposée pour la première fois par le groupe de Ian Jackson, lors d'une étude portant sur l'origine des dépigmentations affectant deux mutants murins de KIT : patch (Ph/+) et rump-white (Rw/+) (Bućan et al., 1995; Duttlinger et al., 1995; Jordan and Jackson, 2000b). Chez ces mutants, le niveau d'expression et la distribution spatiale de KIT est affectée. Ces mutants ont une forte diminution des mélanoblastes du tronc à E12.5 qui ne correspond pas à la dépigmentation observée chez l'adulte. La dépigmentation chez l'adulte est moins importante que celle suggérée par la perte des mélanoblastes à E12.5. Ainsi, les auteurs ont observé qu'une seconde source de mélanoblastes plus tardive, colonisant l'épiderme vers E15.5 - E16.5, permettait d'atténuer le phénotype de ces souris. Cette étude a pu mettre en évidence l'apparition de mélanoblastes indépendamment de la première vague mais sans en expliquer l'origine (Jordan and Jackson, 2000b). Enfin, une étude chez le poulet a montré l'existence de mélanoblastes distincts de la première voie et positionnés entre les nerfs et le derme à E5 (Niwa et al., 2002).

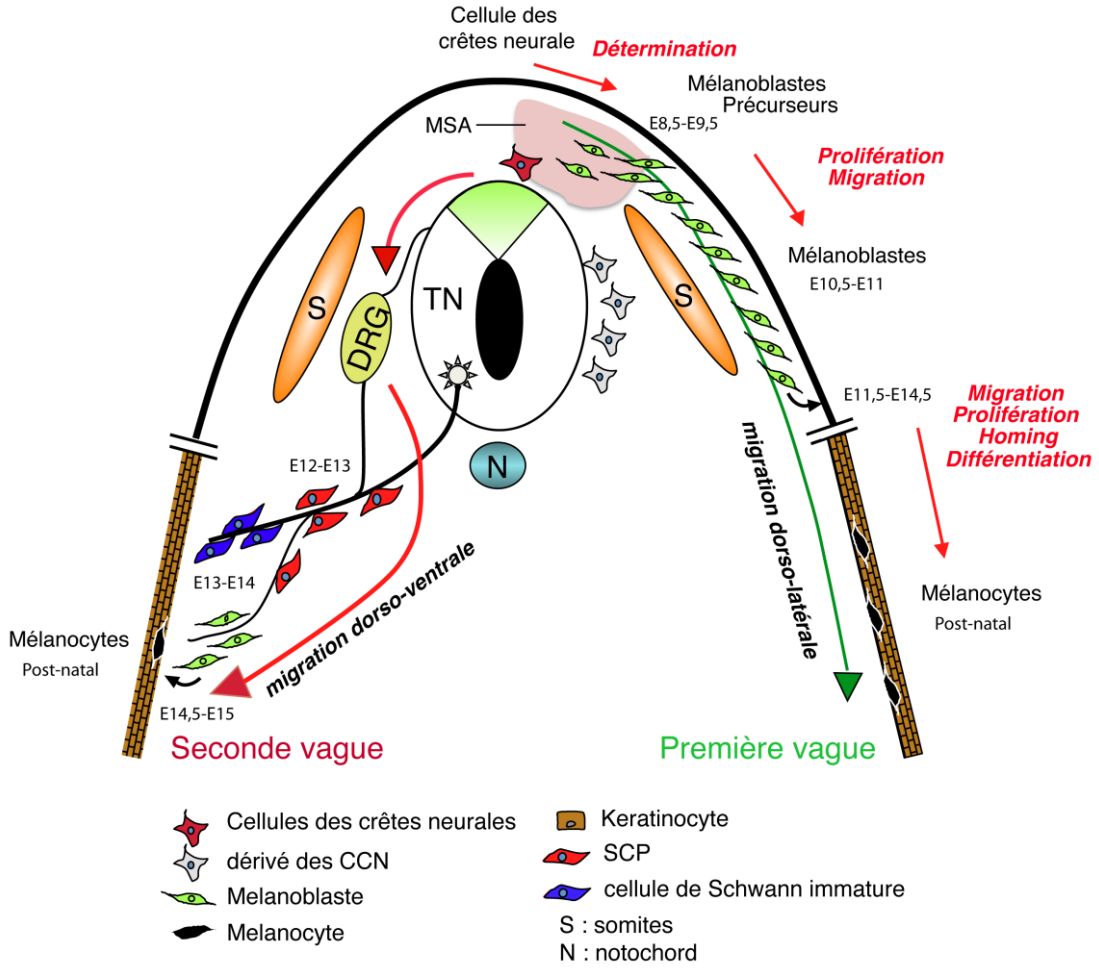


Figure 11 : Les deux vagues du développement des mélanocytes chez la souris *(adapté de Bonaventure et al., 2013). Les cellules des crêtes neurales donnent naissance aux mélanoblastes précurseurs (rouges) qui vont entrer dans la MSA (Migrating staging area). Les mélanoblastes (vert) vont ensuite migrer dorso latéralement (flèche verte) entre les somites (orange) et l'ectoderme (trait noir). Ils vont ensuite atteindre la peau (brun) et se différencier en mélanocytes (noir). Ce processus correspond à la première vague du développement des mélanocytes (flèche verte). Les cellules des crêtes neurales vont donner naissance aux cellules précurseurs de Schwann (rouge) localisées sur les nerfs (trait noir). Ces SCP vont former soit des cellules de Schwann (bleu), soit des mélanoblastes (vert) qui se détachent des nerfs et migrent vers l'épiderme (brun). Une fois dans l'épiderme, les mélanoblastes vont se différencier en mélanocytes (noir). La formation de mélanocytes depuis les SCP est appelée seconde vague (flèche rouge).*

1.2.2.b La mise en évidence de l'origine des mélanoblastes depuis les SCP et ses controverses

L'étude ayant récemment mis en évidence que les mélanoblastes peuvent dériver des SCP migrant dorso-ventralement utilise un modèle murin (PLP ::Cre ; Rosa26-YFP) qui produit la protéine fluorescente YFG dans les cellules exprimant le transgène PLP::Cre et leur descendance (cf. annexe 1) (Leone et al., 2003; Srinivas et al., 2001; Adameyko et al., 2009). PLP (proteolipid protein) est une protéine considérée comme étant un marqueur du lignage glial à partir du stade SCP (Maro et al., 2004). Grâce à ce modèle murin (PLP ::Cre ; Rosa26-

YFP), le groupe de Patrik Ernfors a pu mettre en évidence l'existence de mélanoblastes ventraux MITF+ / YFP+ proches des extrémités nerveuses à E12 et atteignant ultérieurement l'épiderme (fig.11). Puis, l'utilisation d'un modèle inductible (PLP ::Cre^{ERT2} ; Rosa26-YFP) injecté avec du tamoxifène à E11, après la détermination de la première vague, a montré l'existence de cellules de Schwann YFP+ dans les nerfs et de mélanocytes DCT+ / YFP+ dans les follicules pileux ainsi que dans les zones non pileuses du tronc et des pattes. Ces auteurs ont également réalisé chez le poulet une ablation du DRG, pour empêcher la formation des nerfs à E3.5 (HH22), soit après la migration dorso-latérale des mélanoblastes. Cette ablation du DRG induit la perte des mélanoblastes dorso-ventraux. Enfin, l'utilisation d'un modèle murin exprimé plus tardivement à E16 dans les cellules de Schwann (Krox20 ::Cre ; Rosa26YFP) n'a pas montré l'existence de cellules MITF+ / YFP+, suggérant que les mélanoblastes ne dérivent pas des cellules de Schwann pro-myélinisante ou myélinisantes (Topilko et al., 1994; Voiculescu et al., 2000; Adameyko et al., 2009). Ces observations leur ont permis de mettre en évidence la présence de mélanoblastes sur la voie de migration dorso-ventrale des CCN et la formation de mélanoblastes depuis les SCP. Dans cette étude, le groupe de Patrik Ernfors suggère également que la majorité des mélanoblastes du tronc et des pattes dérivent des SCP car ils sont DCT+/YFP+ chez la souris PLP ::Cre ; Rosa26-YFP (Adameyko et al., 2009; Adameyko and Lallemend, 2010).

Cependant, si l'existence de la seconde vague des mélanoblastes avait été précédemment observée, l'origine de ces mélanoblastes depuis les SCP reste controversée. La nature de ces SCP est d'ailleurs remise en question : plutôt que d'être un précurseur du linéage glial, les SCP pourraient être un précurseur bipotent pour ces deux lignages. En outre, il semblerait que le modèle murin utilisé dans l'étude du groupe de Patrik Ernfors PLP-Cre ne soit pas véritablement spécifique du linéage glial. PLP est une protéine exprimée par les cellules de Schwann adultes et a longtemps été considérée comme un marqueur spécifique de ce lignage à partir du stade SCP. Cependant, de nombreuses études récentes ont prouvé que l'expression de PLP n'est pas restreinte aux seules cellules de Schwann mais qu'elle est aussi exprimée dans plusieurs dérivés des CCN (Hari et al., 2012). Au cours du développement chez la souris, PLP est exprimé dans les neurones du cerveau et du SNP à E10.5 et E15.5 (Michalski et al., 2011), mais aussi dans les mélanoblastes du tronc dans l'épiderme à E15.5 (Colombo et al., 2012). PLP est également exprimé chez l'adulte dans les cellules de Schwann, les astrocytes et les neurones (Guo et al., 2009). Il est donc possible que le modèle murin (PLP ::Cre ; Rosa26-YFP), plutôt que suivre la descendance du lignage glial, permette de suivre la descendance des précurseurs neuronaux/gliaux/mélanocytaires migrant dorso-ventralement dans l'embryon (fig.11). La question du type de cellule à l'origine de ces mélanoblastes migrant dorso-ventralement n'est pas complètement résolue. Nous conserverons cependant le terme SCP dans ce manuscrit pour désigner les cellules à l'origine des mélanoblastes ventraux.

La seconde controverse issue de l'article ayant mis en évidence que les mélanoblastes dérivent des SCP, concerne la contribution de ces mélanoblastes ventraux à la population de

mélanocytes chez l'adulte, par rapport à la première vague (Adameyko et al., 2009). Le groupe de Patrik Ernfors, se basant sur le suivi du lignage de son modèle murin (PLP ::Cre ; Rosa26-YFP), affirme que la majorité des mélanocytes du tronc et des pattes dérivent des SCP (Adameyko et al., 2009; Adameyko and Lallemend, 2010). Cette affirmation semble restrictive compte tenu des nombreuses études précédentes, selon lesquelles des mélanoblastes de la première vague colonisent et persistent dans le tronc (Mackenzie et al., 1997; Douarin and Kalcheim, 1999; Jordan and Jackson, 2000b; Wilkie et al., 2002; Luciani et al., 2011). De plus, chez le poulet, une étude a récemment suggéré en éliminant le TN après l'émergence des mélanoblastes de la première vague, que cette seconde vague de mélanoblastes colonise majoritairement la partie hypaxiale (ventrale) de l'embryon (Nitzan et al., 2013b). Des études complémentaires sont toutefois nécessaires afin de déterminer quels sont les territoires peuplés par ces deux vagues de mélanoblastes.

1.2.2.c Le développement des mélanoblastes de la seconde vague

Depuis la découverte des SCP comme source de mélanoblastes, d'autres études ont permis de comprendre plus précisément l'apparition et la voie de migration de ces mélanoblastes de la voie ventrale (fig.11 et 12) (Adameyko et al., 2009). Au niveau cranial, des cellules MITF+/SOX10+ (mélanoblastes) apparaissent dès E9.5 au niveau des ganglions craniaux chez la souris, leur nombre augmente à E10 puis ces cellules se dispersent au niveau de la tête et de la face à E10.5 (Adameyko et al., 2009). Les mélanoblastes sont observés préférablement à la surface des nerfs au contact de la peau. Ces cellules expriment MITF, SOX10 mais aussi DCT, KIT, TUJ1 (marqueur de neurones) et certains mélanoblastes proches des nerfs expriment BFABP (marqueur de SCP) (Adameyko et al., 2012). Au niveau troncal, les premiers mélanoblastes au niveau des nerfs sont observés à HH22 chez le poulet (E3.5), des mélanoblastes se trouvent aussi sur des fibres TUJ1+. Puis, ces cellules augmentent en nombre et se localisent au niveau des nerfs innervant les muscles et la peau à HH27-29 (E5-6). La plupart des cellules MITF+ se trouvent proches mais pas au contact direct des nerfs. Des mélanoblastes au niveau de la paroi dorsale et latérale de l'embryon sont aussi observés (fig.12). On retrouve les mêmes événements chez la souris : quelques cellules MITF+ sont associées aux nerfs spinaux à E12 et leur nombre augmente à E13. Ces mélanoblastes sont souvent associés aux nerfs cutanés avant d'atteindre l'épiderme (Adameyko et al., 2009). Chez le poisson zèbre, l'existence de mélanoblastes se formant à partir des SCP localisés sur les nerfs a aussi été observée au cours du développement (Budi et al., 2011; Dooley et al., 2013).

Il semble que les SCP transitent par les DRG au cours de leur migration (fig.11-12). Lorsque les DRG sont extraits, à E13.5 chez la souris et à E4-6 chez le poulet, ils sont capables de former en culture, neurones, mélanocytes et cellules de Schwann (Nichols and Weston, 1977; Motohashi et al., 2013). De plus, quand le DRG est éliminé dans l'embryon de poulet à HH22 (E3.5), il y a une diminution du nombre de mélanoblastes (Adameyko et al., 2009). Enfin, la migration dorso-ventrale des SCP via les DRG puis le long des nerfs pour atteindre la peau et

former des mélanocytes (fig.12) a été montrée *in vivo* chez le poisson zèbre (Dooley et al., 2013). Cette migration est dépendante de la signalisation ErbB, l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie de signalisation empêchent la migration des cellules gliales et induit la perte les mélanophores MITFA+. Les auteurs suggèrent aussi que les DRG agissent comme une niche participant à la survie et la migration des précurseurs bipotents puisqu'une ablation des DRG induit également une perte des mélanophores (Dooley et al., 2013).

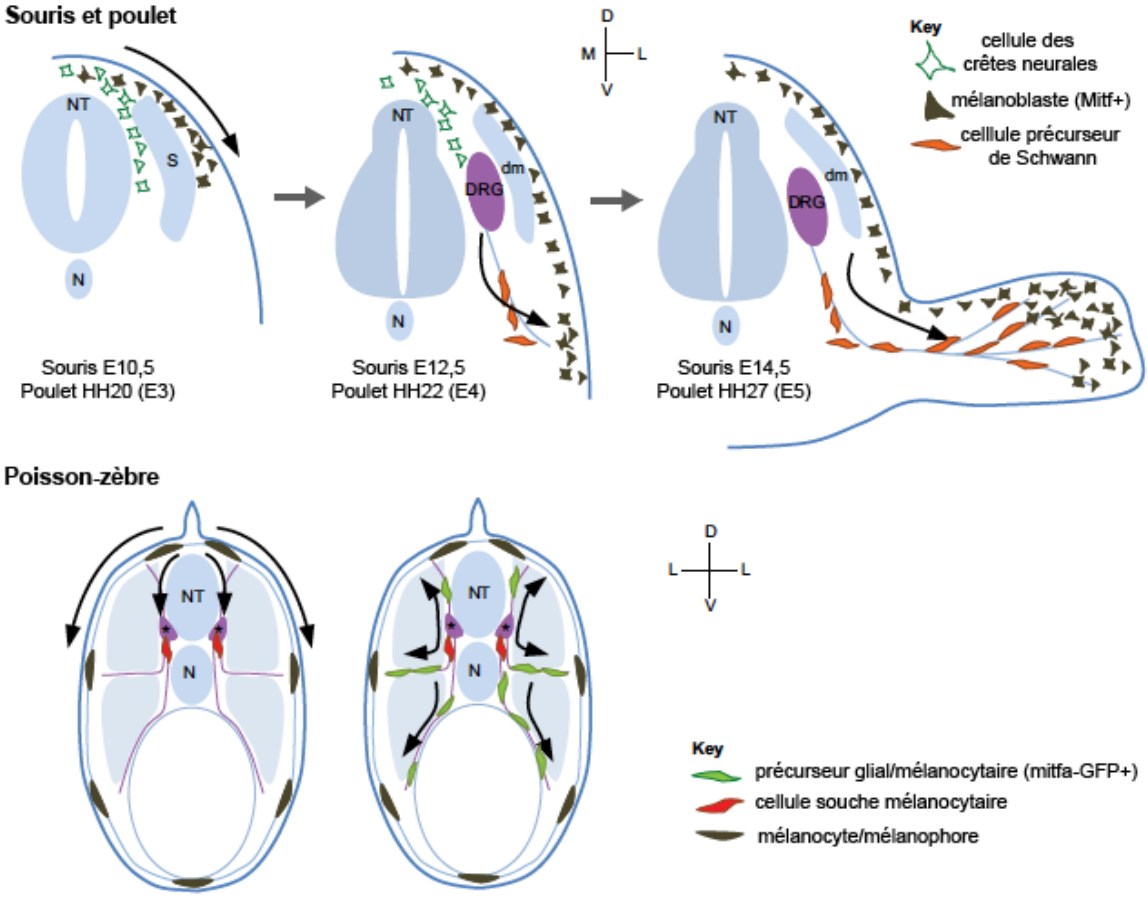


Figure 12 : Le développement des mélanocytes chez la souris, le poulet et le poisson zèbre (adapté de Mort et al., 2015). *Chez la souris à E10.5 et le poulet à E3, une première vague de CCN va migrer dorso-ventralement (vert) tandis que les mélanoblastes (noir) migrent dorso-latéralement dans l'embryon. Les CCN ayant migrés dorso-ventralement vont atteindre le DRG (violet) et ce sont des SCP (rouge) qui migrent hors du DRG le long des nerfs. A E14.5 chez la souris et E5 chez le poulet, des mélanoblastes proches des nerfs migrent pour atteindre l'épiderme dans les membres. Chez le poisson zèbre, l'image de gauche représente les cellules présentes dans la forme embryonnaire tandis que l'image de droite représente la forme adulte du poisson zèbre, après la métamorphose. Les mélanophores (noir) migrent dorso-latéralement tandis que les cellules souches mélanocytaires (rouge) migrent dorso-ventralement vers les DRG (violet). Par la suite, les précurseurs gliaux/mélanocytaires migrent dorso-ventralement et médialement pour atteindre la peau.*

1.2.3. Les protéines de la détermination des cellules de Schwann et des mélanoblastes de la seconde vague

Les mécanismes moléculaires de la détermination des SCP en mélanoblastes ou en cellules de Schwann sont encore méconnus. De nombreuses questions sont à l'heure actuelle en suspens comme : quelle est la nature des précurseurs SCP ou encore quels sont les acteurs moléculaires responsables de la détermination des SCP en mélanoblastes *vs* cellules de Schwann ? Très peu d'études ont été menées à ce sujet, mais certaines évidences suggèrent une implication du contact cellulaire (fig.12). Selon cette hypothèse, les SCP restant au contact des nerfs établissent des interactions cellulaires avec les neurones leur permettant de recevoir des signaux moléculaires induisant leur spécification en cellule de Schwann. En revanche, les cellules qui se détachent des nerfs, échappent à cette programmation par les neurones et deviennent des mélanoblastes migrant le long des fibres nerveuses jusqu'à atteindre l'épiderme (Adameyko et al., 2009). Dans le chapitre suivant seront décrit les acteurs moléculaires connus pour l'instant pour être impliqués dans la détermination des cellules de Schwann ou des mélanoblastes de la seconde vague.

1.2.3.a Les facteurs de transcription : FOXD3 et SOX2

FOXD3 est un facteur de transcription essentiel pour le développement des CCN et leur spécification (Pohl and Knöchel, 2001; Lister et al., 2006; Teng et al., 2008; Nitzan et al., 2013b). *FoxD3* possède deux régions promotrices régulant son expression de manière temporelle et spatiale, l'un NC1 régule l'expression de *FoxD3* au niveau cranial et l'autre NC2 au niveau troncal et vagal (Simões-Costa et al., 2012). L'expression de *FoxD3* est activée par les facteurs de transcription TCF1, ZIC1, PAX3, PAX7 et MSX1/2, des protéines régulant la spécification des CCN (fig. 6) (Simões-Costa et al., 2012; Janssens et al., 2013; Milet et al., 2013; Plouhinec et al., 2014). Le gène *FoxD3* est exprimé par les CCN, par la suite cette expression est soit maintenue dans les futures cellules de Schwann soit réprimée dans les futurs mélanoblastes (Kos et al., 2001; Nitzan et al., 2013b). L'activation de l'expression de *FoxD3* dans les futures cellules de Schwann est due à la présence des protéines SOX9 et SNAIL2 (Nitzan et al., 2013a). Concernant la répression de *FoxD3* lors de la spécification des mélanocytes, des études montrent le rôle de la protéine HDAC1 (histone deacetylase 1) chez le poisson zèbre (Ignatius et al., 2008; Greenhill et al., 2011). Cependant, tous les acteurs du réseau de gènes et les facteurs environnementaux impliqués dans la répression ou la maintenance de l'expression de *FoxD3* ne sont pas encore connus. Si l'expression de *FoxD3* n'est pas réprimée dans les futurs mélanoblastes, on observe une diminution du nombre de mélanoblastes et une augmentation du nombre de cellules de Schwann (Nitzan et al., 2013b). Inversement, si *FoxD3* est artificiellement réprimé dans les CCN *in vivo* chez le poulet, on observe une augmentation des mélanoblastes (Kos et al., 2001). Il a été montré chez le poisson zèbre que la protéine FOXD3 est capable de réprimer directement l'expression de *Mitf*, empêchant la spécification des CCN en mélanoblastes (Curran et al., 2009, 2010). Chez le poulet, FOXD3 peut aussi empêcher l'activation de

l'expression de *Mitf* par PAX3 en interagissant directement avec PAX3, le rendant indisponible pour activer le promoteur de *Mitf* (Thomas and Erickson, 2009). Ainsi, par son expression ou sa répression au moment de la spécification des CCN, *FoxD3* détermine le choix du destin cellulaire entre mélanoblastes et cellules de Schwann.

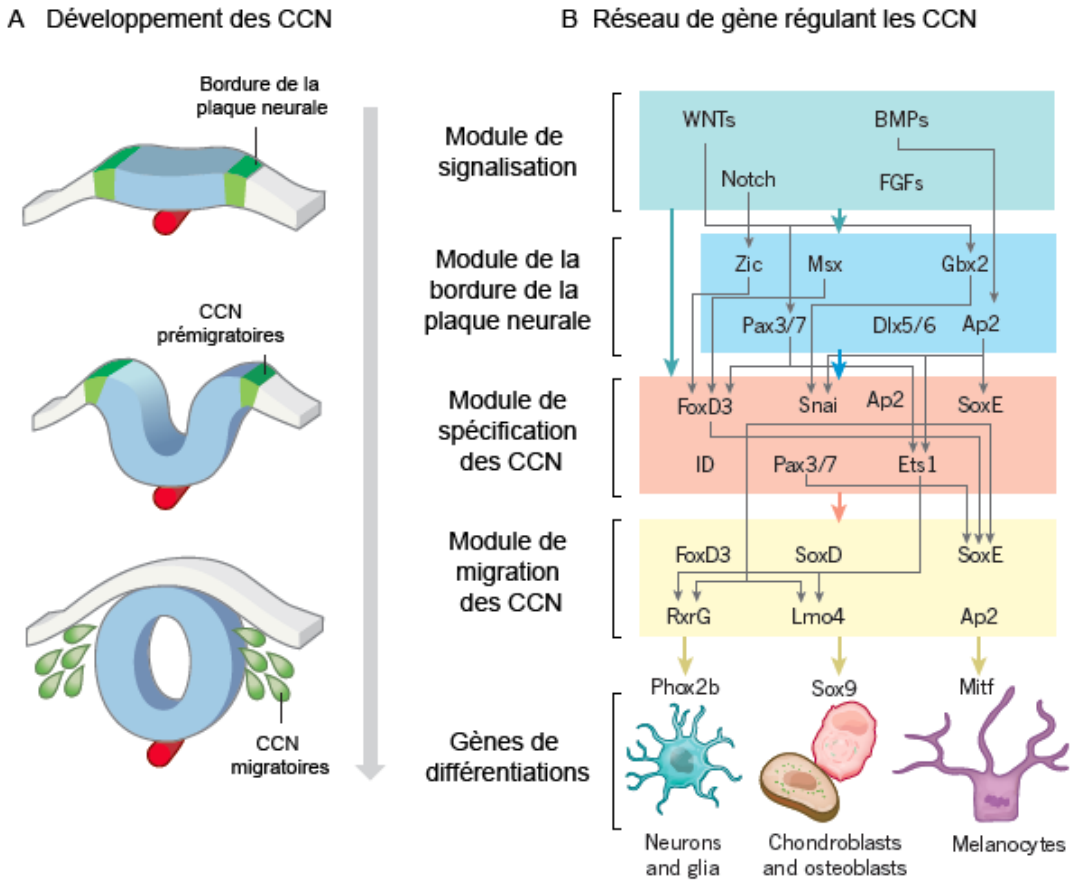


Figure 13 : Réseau de gènes du développement et de l'induction des CCN *(Adapté de Green et al., 2015). (A) Les CCN sont issues des cellules de la bordure de la plaque neurale (vert), les CCN pré-migratoires se forment lors de la neurulation puis migrent hors du TN pour coloniser l'embryon. (B) Il existe un réseau de gènes régulant hiérarchiquement chaque étape du développement des CCN : depuis l'induction des CCN jusqu'à la différenciation de leur dérivés. La dénomination SOXE regroupe les protéines SOX9 et SOX10 tandis que SOXD regroupe SOX5 et SOX6.*

Comme SOX10 mentionné précédemment, SOX2 est aussi un facteur de transcription de la famille des protéines « SRY-related high-mobility group box ». SOX2 inhibe la différenciation neurale, la différenciation gliale et la myélinisation, chez le poulet et la souris. L'expression de *Sox2* maintient les précurseurs neuronaux et gliaux dans un état de précurseur immature pour les neurones et les cellules de Schwann (Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003; Le et al., 2005). SOX2 agit aussi comme un répresseur de la détermination mélanocytaire chez la souris et le poulet : il est capable d'inhiber directement l'expression de *M-Mitf* en se fixant sur son promoteur (Adameyko et al., 2012). Il a également été montré que l'expression ectopique de *M-Mitf* diminue l'activité transcriptionnelle de *Sox2,* MITF est donc

également un acteur dans le maintien du destin mélanocytaire (Adameyko et al., 2012; Mort et al., 2015). Ainsi, la diminution de l'expression de *Sox2* est nécessaire pour que les SCP puissent se différencier en cellule de Schwann ou en mélanocytes.

1.2.3.b Les facteurs de croissance : NRG1, IGF1, PDGF et HGF

Les Neuregulines (NRG) sont des protéines sécrétées activant les récepteurs tyrosine kinase de la famille ErbB. Il existe 4 NRG (NRG1-4) impliquées dans diverses fonctions cellulaires des cellules de Schwann immatures : prolifération, migration, survie et différenciation ainsi que dans l'interaction des cellules de Schwann avec les neurones du système nerveux périphérique (Buonanno and Fischbach, 2001). Au cours du développement, NRG1 produit par les axones, est essentiel à la survie, la migration et la prolifération des SCP (Dong et al., 1995; Adameyko and Lallemend, 2010; Perlin et al., 2011; Ortega et al., 2012). Par la suite, NRG1 induit la détermination des SCP en cellules de Schwann tout en inhibant la différenciation en mélanoblaste (Adameyko et al., 2009). Enfin, cette protéine est aussi impliquée dans la différenciation des cellules de Schwann immatures en cellules de Schwann myélinisantes par l'activation de la signalisation ErbB3 induisant l'expression des gènes de myélinisation (Nave and Schwab, 2005; Sheean et al., 2014).

IGF1 (insulin growth factor 1), PDGF (platelet-derived growth factor) et HGF (hepatocyte growth factor) sont des facteurs de croissance. IGF1 et PDGF sont produits par les nerfs en développement (Meier 1999). Il a été montré *in vitro* que IGF1, PDGF et HGF favorisent la survie et la production de mélanoblastes par les SCP, au détriment des cellules de Schwann. Ainsi IGF1 et PDGF semblent agir d'une manière opposée à NRG1 (Adameyko et al., 2009; Adameyko and Lallemend, 2010; Ernfors, 2010).

1.2.3.c La signalisation WNT/β-CATÉNINE

Les protéines WNT et leurs récepteurs sont exprimés au niveau des nerfs dès E12.5 chez la souris (Grigoryan et al., 2013). Dans le mésoderme, l'expression de *FoxD3*, protéine essentielle dans la spécification des SCP, est activée par TCF1, un co-facteur de β-CATÉNINE (Janssens et al., 2013). Cette même étude a aussi mis en évidence une fixation de β-CATÉNINE en amont du locus du gène *FoxD3*. Ainsi, au niveau temporel et moléculaire, il est donc possible que β-CATÉNINE soit impliquée dans la détermination des SCP sur les nerfs. De plus, de nombreuses études ont montré le rôle de la voie WNT dans la différenciation des cellules de Schwann (Meffre et al., 2015). WNT1 augmente la transcription des gènes responsables de la myélinisation, via la fixation de β-CATÉNINE sur les promoteurs de PMP22 et MPZ. Il a aussi été montré que β-CATÉNINE induit l'expression des protéines MBP et PLP essentielles à la maturation et la myélinisation des cellules de Schwann (Meffre et al., 2015). Une perte de fonction de la voie WNT *in vivo* chez le poisson zèbre, par des extinctions des gènes LRP6 (lrp6Δc mRNA) et TCF3 (Δtcf3) induisait une hypomyélinisation des cellules de Schwann sans en affecter le nombre (Tawk et al., 2011).

Chez la souris, la perte de l'expression de β-CATÉNINE au moment de la myélinisation (Dhh ::Cre ; bcatΔexon2-6$^{flox/flox}$), ralenti la myélinisation *in vitro* et diminue l'expression des protéines de myélinisation (Jaegle et al., 2003; Lewallen et al., 2011). Des expériences de gain (bcatΔex3) et perte de fonctions (Δbcat) de β-CATÉNINE chez la souris (Cnp ::Cre et HTN ::Cre), ont également montré un rôle essentiel et *dose dépendant* de β-CATÉNINE pour le tri radial, étape précédent la myélinisation (Grigoryan et al., 2013). Il a d'ailleurs été montré que GSK3β était un régulateur négatif de la différenciation et de la myélinisation des cellules gliales (Azim and Butt, 2011). Ainsi, la voie WNT / β-CATÉNINE est impliquée dans la différenciation et la myélinisation des cellules de Schwann.

1.2.3.d TUJ1

TUJ1 ou TUBB3 est une protéine du cytosquelette de la famille des tubulines exprimée par les neurones du SNS et SNP. TUJ1 a servi à de nombreuses reprises comme marqueur des neurones, jusqu'à ce que des études montrent son expression dans des mélanocytes adultes, des cellules gliales de la peau et les cellules MITF+ sur les nerfs (Adameyko et al., 2012; Locher et al., 2013a, 2013b). TUJ1 étant exprimée par des cellules adultes mélanocytaire et gliale, il est possible que cette protéine soit aussi exprimée par les SCP (Locher et al., 2015). A notre connaissance aucune étude n'a porté à ce jour sur l'expression de cette protéine par les CCN même si nombre de ses dérivés l'expriment.

1.3. Les indications d'un lien embryonnaire entre mélanocytes et cellules de Schwann chez l'adulte

1.3.1. La régénération et la reprogrammation cellulaire

L'étude de la détermination *in vitro* des CCN a permis de mettre en évidence les réseaux moléculaires impliqués dans leur spécification mais également la possibilité de reprogrammer certains dérivés des CCN (Henion and Weston, 1997; Le Douarin and Kalcheim, 1999). L'étude de la reprogrammation cellulaire a souvent des objectifs thérapeutiques mais elle permet surtout de mieux appréhender certaines propriétés intrinsèques des cellules étudiées. EDN3, le ligand du récepteur EDNRB est essentiel pour la migration des mélanocytes de la voie dorso-latérale (cf partie 1.1 de la présente introduction). Cependant, cette protéine a aussi un rôle dans la reprogrammation des mélanocytes et des cellules de Schwann en culture (Dupin et al., 2000, 2003). Lorsque des cellules de Schwann provenant de nerfs de souris adulte sont soumises à l'EDN3, elles peuvent se dédifférencier *in vitro* et former des mélanocytes pigmentés (Dupin et al., 2003). L'inverse a également été démontré, des mélanocytes soumis à de l'EDN3 *in vitro* peuvent former des clones gliaux (Dupin et al., 2000). Les cellules gliales résultant d'une reprogrammation de mélanocytes sont fonctionnelles, puisque l'implantation de ces cellules reprogrammées dans des nerfs sciatiques lésés de rat participent à la régénération de ces nerfs (Chi et al., 2011).

Cette possibilité de trans-différenciation des mélanocytes et des cellules de Schwann adultes peut être mise en parallèle avec ce qui est observé *in vivo* lors de la régénération des nerfs. Lorsqu'un nerf est lésé, les cellules de Schwann sont capables de se dédifférencier, démyéliniser puis proliférer afin de réparer la lésion (Pereira et al., 2012). Il n'est pas rare d'observer l'apparition de cellules pigmentées au cours de la régénération après une blessure du nerf sciatique chez la souris (Adameyko et al., 2009). Il est donc possible que les cellules de Schwann adultes se dédifférencient en précurseurs bipotents formant des cellules de Schwann afin de réparer la lésion, mais également des mélanocytes. Cependant, cette production de mélanocytes au cours de la régénération nerveuse n'a pas encore été expliquée. Il a été montré que ce processus est dépendant de la présence de la protéine NF1, les souris hétérozygotes pour ce gène ($NF1^{+/-}$) ne produisent pas de mélanocytes au cours de la régénération des nerfs, mais le rôle de NF1 n'a pas été clairement défini (Rizvi et al., 2002). Ces expériences n'excluent pas la présence de cellules souches bipotentes chez l'adulte dans une niche à proximité des nerfs, qui permettrait aussi la régénération du nerf en se différenciant. Tous ces éléments tendent à montrer que les cellules de Schwann et les mélanocytes adultes conservent des propriétés intrinsèques liées à leur origine commune, une sorte de « mémoire » de leur état bipotent du temps du développement, qu'il est possible de réactiver *in vitro* ou *in vivo* lors d'un stress ou par addition du bon cocktail de facteurs.

1.3.2 Les cellules souches des crêtes neurales chez l'adulte

Cette facilité avec laquelle il est possible de retrouver des caractéristiques cellulaires d'un précurseur par reprogrammation *in vitro* ou au cours d'une lésion *in vivo*, adresse la question de la présence de cellules souches des crêtes neurales chez l'adulte (Dupin et al., 2007; Dupin and Sommer, 2012; Achilleos and Trainor, 2012). De nombreuses études ont montré la capacité de multipotence de cellules extraites de tissus adultes comme les nerfs ou encore la peau chez la souris et l'humain (Morrison et al., 1999; Toma et al., 2005). Ces cellules souches dérivées de la peau (SKP = skin derived precursors) sont capables de générer *in vitro* des neurones, cellules gliales, adipocytes et des cellules musculaires lisses. Au niveau moléculaire, elles sont caractérisées par l'expression des protéines nestine et fibronectine (Toma et al., 2001, 2005; Fernandes et al., 2004). Depuis cette découverte, de nombreuses études se sont intéressées au potentiel de ces cellules pour la médecine régénérative, notamment au niveau du système nerveux périphérique. Cet intérêt est d'autant plus important que la peau est un organe facilement accessible pour prélever ces SKP. Ainsi, des études ont pu montrer que des SKP provenant du derme ou du follicule pileux sont capables de participer à la régénération de nerfs et de lésions de la colonne vertébrale (Amoh et al., 2005, 2012; McKenzie et al., 2006; Sieber-Blum et al., 2006). Enfin les SKP peuvent participer à la régénération osseuse chez le rat (Lavoie et al., 2009). Des études sont actuellement encore en cours sur les applications thérapeutiques possibles. On peut donc s'interroger sur les limites du potentiel de ces cellules puisqu'il a été montré que des SKP peuvent former, non seulement tout le répertoire des dérivés des CCN, mais même plus encore comme, par exemple des cellules dérivant du mésoderme (Toma et al., 2001). Si l'utilisation des SKP

s'avérait applicable chez l'Homme, elle constituerait un grand espoir pour le traitement de nombreuses maladies. Il serait néanmoins nécessaire de contrôler le potentiel prolifératif de ces cellules pour éviter une transformation tumorale de ses dérivés.

1.3.3. La neurofibromatose

Depuis la mise en évidence d'une seconde source de mélanoblastes à partir des SCP, l'étiologie des pathologies présentant des troubles à la fois nerveux et pigmentaires a été réexaminée. Le but était de mettre en évidence des marqueurs moléculaires communs à ces deux lignages et impliqués dans la pathogenèse de ces maladies. La neurofibromatose est l'une de ces pathologies, il en existe deux types : la neurofibromatose de type I et de type II. Nous nous intéresserons uniquement à la première qui est la mieux caractérisée du point de vue pigmentaire. La neurofibromatose de type I est une maladie génétique dominante due à la mutation du gène *Nf1*, un suppresseur de tumeur (Wallace et al., 1990). L'incidence de cette pathologie est de 1/3500 et sa caractéristique principale est le développement spontané et récurrent de tumeurs des cellules de Schwann comme les neurofibromes. Les neurofibromes sont des tumeurs bénignes des nerfs qui sont composées d'une population hétérogène de cellules de Schwann, neurones, fibroblastes, cellules endothéliales et mastocytes. Ces tumeurs peuvent aussi être pigmentées. Les neurofibromes évoluent dans 10% des cas pour devenir métastatiques et très agressifs ; ils sont pour l'instant incurables (McClatchey, 2007). Les patients NF1 présentent également des troubles pigmentaires comme une présence systématique de macules café au lait, une hyperpigmentation localisée ou généralisée ou encore un *naevus* congénital géant dans certains cas (De Schepper et al., 2005). Si la neurofibromatose est due à la mutation d'un allèle du gène *Nf1* au niveau germinal, les macules café au lait sont dus à la mutation somatique du second allèle de ce gène dans les mélanocytes (Boucneau et al., 2005; Van Raamsdonk and Deo, 2013; De Schepper et al., 2008). La présence de symptômes touchant à la fois les mélanocytes et les cellules de Schwann suggère l'implication de ce gène dans les lignages mélanocytaires et Schwannien. De plus, cette protéine est aussi impliquée dans la production de cellules pigmentées au cours de la régénération des nerfs (Rizvi et al., 2002).

Le gène *Nf1* code pour la protéine neurofibromine (NF1) exprimée par les CCN pré-migratoires ainsi que dans certains de ses dérivés comme les cellules de Schwann et les mélanocytes (Stocker et al., 1995; Diwakar et al., 2008). Une perte ubiquitaire homozygote du gène *Nf1* (NF1-null) chez la souris induit une mort embryonnaire à E12.5 (Wehrle-Haller et al., 2001). Une perte hétérozygote du gène *Nf1* ubiquitaire (Dsk9/+ ou NF1-/+) ou dans le lignage mélanocytaire chez la souris (Mitf::Cre ; $NF1^{flox/+}$) induit une hyperpigmentation, ce qui rappelle les symptômes observés chez les patients atteints de Neurofibromatose de type 1 (Alizadeh et al., 2008; Deo et al., 2012). La perte d'un allèle de *Nf1* lors du développement ($Nf1^{+/-}$), induit une augmentation de la signalisation ERK1/2 et AMPc ce qui active l'expression de *M-Mitf* et augmente l'expression des gènes du lignage mélanocytaire comme *tyrosinase, Dct et Trp1* (Diwakar et al., 2008; Allouche et al., 2015). Dans les doubles

mutants hétérozygotes pour *Nf1* et *KitL* ($Mgf^{Sl-/+}$ /$NF1^{-/+}$), les mélanoblastes sont incapables de suivre la voie de migration dorso-latérale ce qui suggère l'implication de la signalisation KIT et NF1 dans la migration dorso-latérale des mélanoblastes (Wehrle-Haller et al., 2001). La protéine NF1 est un régulateur négatif de la protéine RAS (rat sarcomas) appartenant à la voie de signalisation MAPK. La stimulation *in vitro* par KIT-L des mélanocytes $Nf1^{+/-}$ active de manière plus importante la signalisation MAPK (mitogen activated protein kinase) responsable de l'activation de *M-Mitf* (Diwakar et al., 2008). La voie de signalisation MAPK est connue pour être mutée dans deux nombreux cancers dont les mélanomes (Samatar and Poulikakos, 2014). Chez l'adulte, la perte de l'expression de *Nf1* par les mélanocytes induit la sénescence et ce gène est souvent muté dans des cas de mélanomes métastatiques (Nissan et al., 2014; Larribere et al., 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015). Ces résultats montrent un rôle important de la protéine NF1 dans les lignages mélanocytaires et schwanniens.

2. LES MÉLANOCYTES

Les mélanoblastes dérivent des cellules des crêtes neurales de façon directe ou indirecte. Une fois les mélanoblastes déterminés, ils vont migrer dans leur organe cible où ils se différencieront en mélanocytes. Dans ce chapitre, nous allons décrire plus précisément les différentes fonctions et localisations des mélanocytes en nous intéressant plus particulièrement aux mélanocytes de la peau, notre sujet d'étude.

2.1. Description

2.1.1. Les localisations et les fonctions des mélanocytes

2.1.1.a Les mélanocytes et leurs fonctions

Les mélanocytes sont des cellules pigmentaires dendritiques dont le principal organe cible est la peau (mélanocytes classiques), mais il existe également des mélanocytes non classiques dans d'autres organes tels que les yeux (iris), le cœur, l'oreille interne, la cochlée, le tissu adipeux et le cerveau (mésencéphale) (fig.14). Les mélanocytes ont des fonctions qui varient selon leurs localisations dans l'organisme (Plonka et al., 2009). Cependant, trois rôles majeurs peuvent être dégagés. La première fonction des mélanocytes est la pigmentation de la peau, des yeux et des cheveux. Ils ont ensuite un rôle de protection, par exemple contre le rayonnement UV par la production de mélanine (peau et yeux) et un rôle détoxifiant par la réduction du stress oxydatif (peau, cœur) ou la réduction de l'inflammation (cerveau). Enfin, les mélanocytes ont aussi un rôle sensitif : dans la vision (yeux), l'ouïe (cochlée) et l'équilibre (oreille interne). Tous ces mélanocytes ont des fonctions essentielles dans chacun de leurs organes cibles et une perturbation du fonctionnement ou du nombre de ces cellules peut engendrer des malformations (Yamaguchi and Hearing, 2014; Mort et al., 2015). Par exemple, chez les souris mutée pour *β-caténine* dans les mélanocytes (Tyr ::Cre ; bcatΔex3), une augmentation du nombre de mélanocytes cardiaques empêche la fermeture du ductus artériosus et entraine la mort des souris au bout de quelques mois (Yajima et al., 2013).

Il a été montré, chez la souris, que les signaux extracellulaires responsables de la prolifération, la différenciation et la survie des mélanocytes sont différents entre les mélanocytes classiques et les mélanocytes non classiques (Aoki et al., 2009). Ces résultats suggèrent à la fois l'existence d'une signalisation intracellulaire différente des mélanocytes selon leur localisation dans l'organisme, mais aussi une nature cellulaire différente de ces mélanocytes (Aoki et al., 2009).

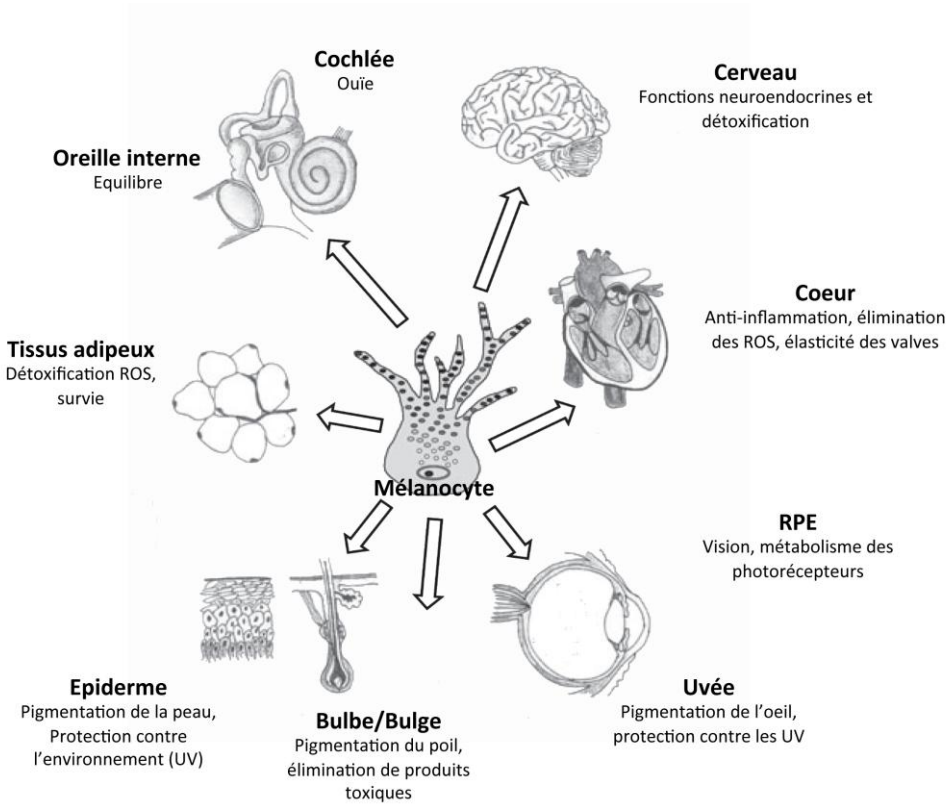


Figure 14 : Les différentes localisations et fonctions des mélanocytes dans l'organisme *(d'après Plonka et al., 2009). Des mélanocytes peuvent se trouver dans le cœur, l'oreille interne, les tissus adipeux, l'œil, l'épiderme ou le follicule pileux. Les mélanocytes ont des fonctions diverses selon leur localisation.*

2.1.1.b Les mélanocytes classiques de la peau

Au cours de notre étude, nous nous focaliserons sur les mélanocytes classiques de la peau. La majorité des mélanocytes de la peau se situent, pour les humains, au niveau de la lame basale de l'épiderme (fig.14) et, dans une moindre mesure, dans les follicules pileux (Ortonne and Benedetto, 1981). Il existe des mélanocytes associés aux fibroblastes dans le derme, mais ils sont très peu nombreux et leurs fonctions ne sont pas connues. La densité des mélanocytes dans l'épiderme a été quantifiée chez l'humain grâce à des marquage DOPA, les mélanocytes de l'épiderme du bras et du visage sont estimés respectivement à 1160±40 mélanocytes/mm^2 et 2310±150 mélanocytes/mm^2 (Fitzpatrick and Szabo, 1959). Il a été également montré que la densité des mélanocytes varie en fonction de la localisation anatomique (Whiteman et al., 1999). Il est à noter que chez la souris qui est un mammifère recouvert de fourrure, les mélanocytes se trouvent majoritairement dans les follicules pileux. Ces animaux présentent des mélanocytes au niveau de la lame basale de l'épiderme uniquement au niveau des pattes, de la queue, des oreilles et des moustaches (Bischitz and Snell, 1959; Ortonne and Benedetto, 1981).

2.1.2. La mélanine

2.1.2.a L'eumélanine et la phéomélanine

Les mélanocytes produisent de la mélanine, un pigment, qu'ils transfèrent aux kératinocytes environnants (Aeby, 1885). Il est admis qu'un mélanocyte est en contact, grâce à ses dendrites, avec environ 30-40 kératinocytes, formant ainsi l'unité épidermique de mélanisation (Fitzpatrick and Breathnach, 1963). Il existe deux types de mélanine (fig.15) produite par les mélanocytes de l'épiderme : l'eumélanine (pigment brun-noir) et la phénomélanine (pigment jaune/rouge) (Ortonne and Benedetto, 1981; Lin and Fisher, 2007). L'enzyme essentielle à la production des deux types de mélanine est la tyrosinase (TYR) qui convertit la tyrosine en DOPAquinone (fig.15). La DOPAquinone sera ensuite transformée différemment selon le type de mélanine produite. L'action successive des enzymes daupachrome tautomérase (DCT ou TRP2) puis la tyrosinase-related protein (TRP1) sur la DOPAquinone produit de l'eumélanine. La phéomélanine (fig.15) est produite à partir de la DOPAquinone par différentes étapes au niveau monomère (échanges oxydatifs, cyclisation, décarboxylation) (Fitzpatrick and Szabo, 1959; Kondo and Hearing, 2011).

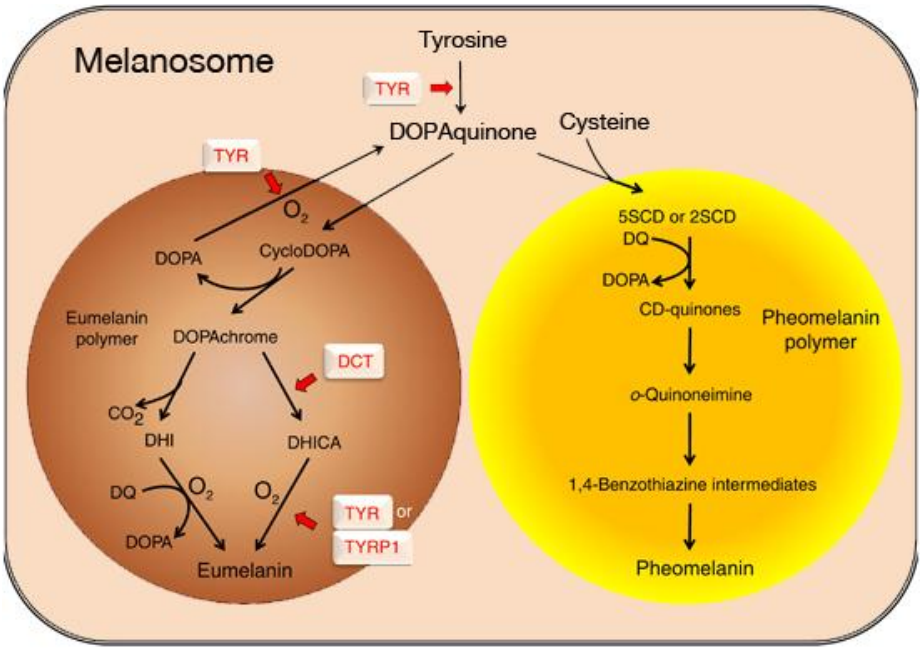


Figure 15 : Voies de synthèses de la mélanine *(Hearing, 2011). La TYROSINE sert de substrat primaire à la production d'eumélanine (brun) et de phéomélanine (jaune). L'action des enzymes TYROSINASE, DCT et TRP1 (Tyrp1) produit de l'eumélanine tandis que d'autres étapes au niveau monomère sont responsables de la production de phéomélanine.*

La pigmentation de la peau est déterminée par le ratio entre les deux types de mélanine (eumélanine et phéomélanine). Ce ratio est dépendant de l'activité enzymatique de la

tyrosinase ainsi que du taux de tyrosine et de cystéine disponible dans le mélanocyte (fig.15). Contrairement aux idées reçues, le nombre de mélanocytes est globalement le même chez tous les individus quelque soit leur couleur de peau (Szabo, 1967). La pigmentation de la peau est classée selon : son intensité, la couleur des yeux, des cheveux et la capacité de la peau à produire de la pigmentation lorsqu'elle est exposée aux rayons ultraviolets (UV) (Kawada, 2000). Les caractéristiques des différents phototypes sont les suivantes :

- type I : une peau claire qui ne bronze jamais, des cheveux blonds/roux, des yeux bleu/vert,
- type II : une peau claire qui bronze à peine, des cheveux blonds/roux à chatains, des yeux clairs bruns,
- type III : une couleur de peau intermédiaire, des cheveux chatains/bruns, des yeux bruns,
- type IV : une couleur de peau mate, des cheveux et des yeux bruns/noirs,
- type V : une peau foncée qui bronze beaucoup, des cheveux/yeux noirs,
- type IV : une peau, des cheveux et des yeux noirs.

2.1.2.b La production et le transfert de la mélanine

La mélanine est produite au sein d'organelles spécialisés, dérivés des lysosomes : les mélanosomes (fig. 16). Le pré-mélanosome (stade I) se forme à partir du trans-Golgi des mélanocytes. Le mélanosome mature au cours de sa migration sur les microtubules vers la périphérie (stade II à stade IV pigmenté) (Yamaguchi and Hearing, 2014). Dès que les mélanosomes se trouvent au niveau des dendrites, ils sont transférés aux kératinocytes adjacents (fig. 16). Plusieurs mécanismes de transfert des mélanosomes d'un mélanocyte aux kératinocytes environnants sont proposés dont le transfert de vésicule . Ainsi, des vésicules membranaires contenant des mélanosomes peuvent être libérés dans l'espace intercellulaire à partir des dendrites du mélanocyte par exocytose (Ando et al., 2012; Tarafder et al., 2014). Ensuite, ces vésicules sont capturées par endocytose au niveau des microvili des kératinocytes (Ando et al., 2012; Tarafder et al., 2014). Les mélanosomes endocytés sont enveloppés dans une membrane qui sera digérée pour libérer le contenu de ces vésicules dans le cytoplasme du kératinocyte. Enfin, dans le cytoplasme les mélanosomes s'organisent autour du noyau de façon à protéger l'ADN des mutations pouvant être induites par l'exposition aux rayonnements UV (Cadet et al., 2005; Wasmeier et al., 2008).

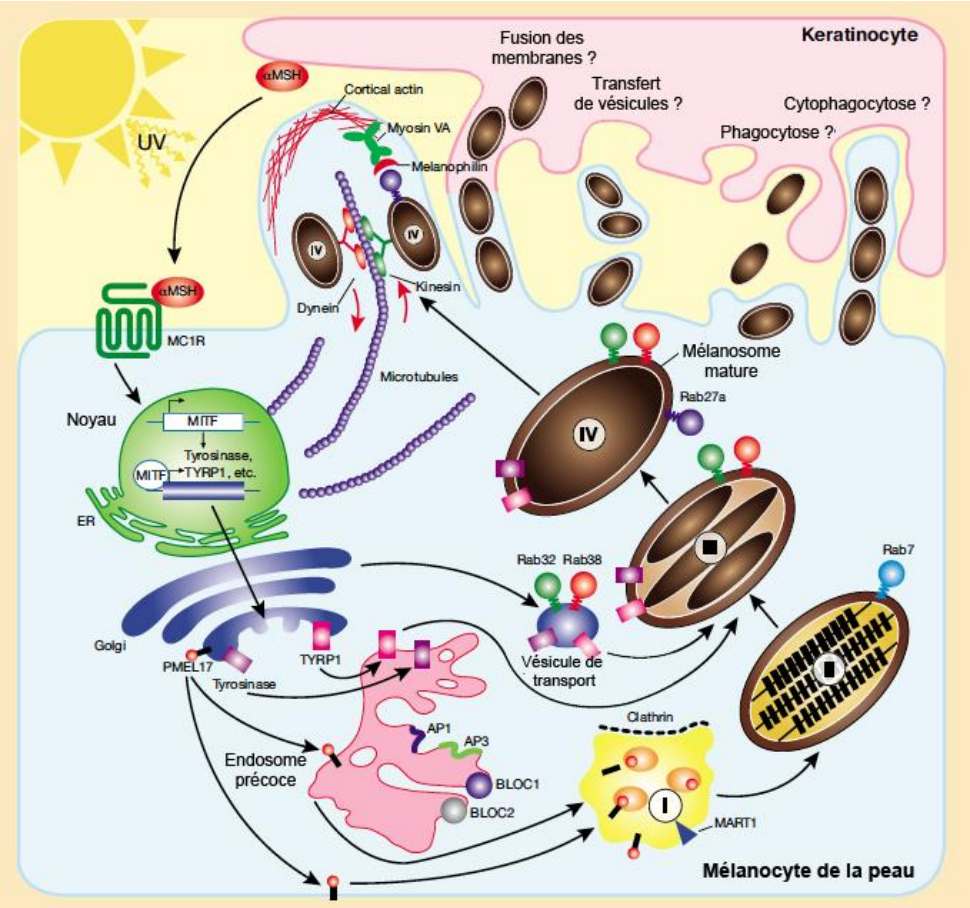


Figure 16 : Mécanismes de production et de tranfert des mélanosomes *(adapté de Wasmeier et al., 2008). Des facteurs externes (UV, α-MSH) ou internes vont activer la transcription de Mitf et de ses gènes cibles, les enzymes de la pigmentation Tyr, Trp1 et Dct. Une fois produites, ces enzymes sont incorporées dans des vésicules endosomales où elles démarrent la synthèse de mélanine. Les pré-mélanosomes vont maturer au fur et à mesure que leur contenance en mélanine augmente. Ils atteignent la périphérie sous leur forme mature et seront transférés aux kératinocytes par fusion des membranes et/ou exocytose et/ou phagocytose et/ou cytophagocytose.*

2.1.2.c La régulation de la pigmentation

MITF est un régulateur clé de la pigmentation par son action activatrice sur l'expression des enzymes *tyrosinase, Trp1* et *Dct* (Hearing, 2007; Kondo and Hearing, 2011). Ainsi, la régulation de la pigmentation s'effectue principalement par la régulation de l'expression de *M-Mitf* (fig.16). *M-Mitf* peut être régulé par des facteurs intrinsèques comme SOX10, un facteur de transcription activant l'expression des gènes *Dct, M-Mitf* et *tyrosinase* dans les mélanoblastes et les mélanocytes (Bondurand et al., 2000; Potterf et al., 2001; Murisier et al., 2007). Dans les mélanocytes amélanotiques provenant de souris mutées pour *Sox10* ($Sox10^{LacZ/LacZ}$), l'ajout de la protéine MITF n'est pas suffisant pour induire l'expression de *tyrosinase* et la production de mélanine (Hou et al., 2006). Il semble que l'activité transcriptomique de MITF soit nécessaire mais pas suffisante pour induire la production de pigment dans ce modèle.

L'expression de *M-Mitf* est également régulée par des facteurs environnementaux comme les rayons ultraviolets (UV) ou les facteurs sécrétés par les autres cellules de l'épiderme (Duval et al., 2002, 2014; Imokawa, 2004). La sécrétion de dicckopf1 (DKK1), un inhibiteur de la voie WNT, par des fibroblastes dermaux d'individus de phototype I, inhibe le transfert de mélanine des mélanocytes aux kératinocytes, et diminue la synthèse de mélanine des mélanocytes (Yamaguchi et al., 2004, 2008). La production de NRG1 par des fibroblastes d'individus de phototype V-VI est capable d'augmenter la pigmentation dans des modèles de peaux reconstruites (Choi et al., 2010). Les rayons UV peuvent induire la mélanogenèse en activant la production de facteurs autocrines et paracrines (fig. 16) dont l'α-MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) et l'endothéline-1 (Wasmeier et al., 2008). L'activation du récepteur MC1R par son ligand l'α-MSH, induit une augmentation intracellulaire d'AMP cyclique, activant la PKA (protéine kinase A) qui active à son tour Mitf par phosphorylation (Schallreuter et al., 2008a). La signalisation cellulaire activée par MC1R va également induire directement l'expression de *M-Mitf, Trp1* et *tyrosinase* (Abdel-Malek et al., 1995; Suzuki et al., 1996; Rouzaud et al., 2006). Ces deux mécanismes d'action de la signalisation induite par l'α-MSH conduisent à la production d'eumélanine et de phénomélanine. Les différentes isoformes de MC1R ont des effets plus ou moins importants sur l'activation des gènes *M-Mitf* et *tyrosinase* (Rouzaud et al., 2006). Ainsi l'expression spécifique de ces différentes isoformes est directement corrélée à la pigmentation des individus (Rouzaud et al., 2006).

2.2. La composition et l'organisation de la peau

2.2.1. La structure et les fonctions de la peau

La peau est un organe complexe dont la fonction principale est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures : pathogènes, chimiques ou rayons ionisants. Elle a aussi un rôle thermorégulateur par la sécrétion de sueur et sensitif grâce aux nombreuses terminaisons nerveuses innervant la peau (Lacombe, 2006). La peau est composée de plusieurs couches (fig. 17), décrites de la profondeur vers la surface (Heath et al., 2008; Kierszenbaum, 2006).

- Le tissu sous-cutané ou hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Elle est constituée principalement d'adipocytes, de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques de gros diamètres.
- Le derme est composé de tissu conjonctif lâche contenant des fibres de collagènes et d'élastines. Il contient des nerfs, des récepteurs sensitifs et la plus grande partie des vaisseaux sanguins cutanés. C'est la couche la plus épaisse de la peau responsable de sa texture et de son élasticité.
- La jonction dermo-épidermique (JDE) ou lame basale correspond à la couche séparant l'épiderme du derme. La JDE est irrégulière et présente des saillies, plus ou moins profondes, nommées papilles et contenant des vaisseaux sanguins ainsi que des terminaisons nerveuses. Cette couche est composée principalement de protéoglycanes, de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et d'entactine.

- Les annexes cutanées sont des structures épidermiques résultant de l'invagination de l'épiderme, c'est le cas des follicules pileux, des glandes sébacées ou des glandes sudoripares. Elles se trouvent au niveau du derme, pour les follicules pileux et les glandes sébacées, ou du tissu sous-cutané dans le cas des glandes sudoripares.
- L'épiderme correspond à la couche supérieure de la peau en contact avec le milieu extérieur. C'est un épithélium pavimenteux stratifié composé principalement de kératinocytes mais il contient également d'autres types cellulaires comme les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

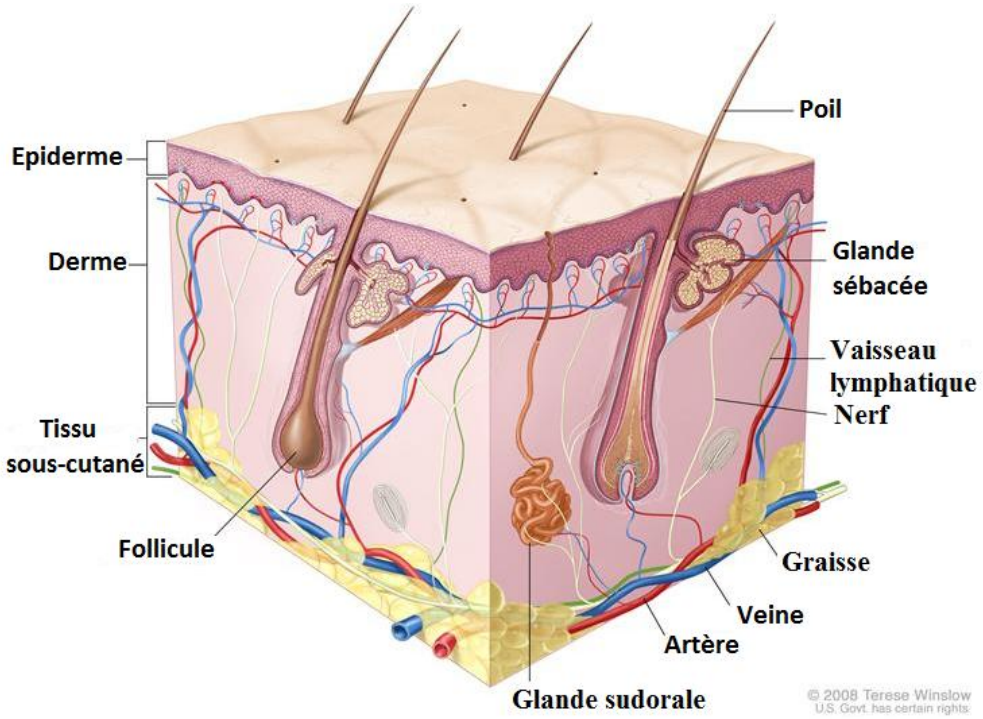


Figure 17 : Structure de la peau *(http://www.anticancerfund.org). La peau est composée de trois couches. L'épiderme est la couche supérieure de la peau. Le derme est la couche médiane de la peau contenant les vaisseaux lymphatiques, les nerfs et les annexes épidermiques (glande sébacée et follicule pileux). Le tissu sous cutané, la couche la plus profonde de la peau, est composé de tissus adipeux et de vaisseaux sanguins (artères et veines).*

2.2.2. L'organisation de l'épiderme

L'épiderme est organisé en quatre couches successives qui sont morphologiquement et fonctionnellement distinctes. Ces couches seront ici décrites de la profondeur vers la surface de l'épiderme (fig 18).

- La couche la plus profonde de l'épiderme est la couche basale, elle se situe entre le derme et l'épiderme. Dans cette couche se trouvent les mélanocytes, les cellules de Merkel mais aussi des cellules souches kératinocytaires responsables du renouvellement de l'épiderme. La succession des divisions mitotiques de ces cellules

souches va permettre de créer de nouveaux kératinocytes. Les kératinocytes nouvellement formés vont migrer progressivement vers la surface de l'épiderme au fur et à mesure des nouvelles divisions. Simultanément à leur migration trans-épidermale, les kératinocytes se différencient.

- La couche supérieure à la couche basale est la couche épineuse. Elle est composée principalement de kératinocytes de forme polyédriques synthétisant activement des filaments de kératines, c'est la forte concentration de kératine qui confère sa résistance à l'épiderme. Des cellules de Langerhans se trouvent également dans cette couche.
- La couche granuleuse, au dessus de la couche épineuse, est composée de kératinocytes de formes allongées en dégénérescence, elle est imperméable à l'eau.
- La dernière couche de l'épiderme, la couche cornée, est composée de cellules mortes sans noyaux ni organelles, mais contenant toujours de la kératine très dense. Les cellules de cette couche se détachent progressivement par desquamation, au fur et à mesure de leur remplacement par d'autres cellules lors du renouvellement de l'épiderme (Heath et al., 2008).

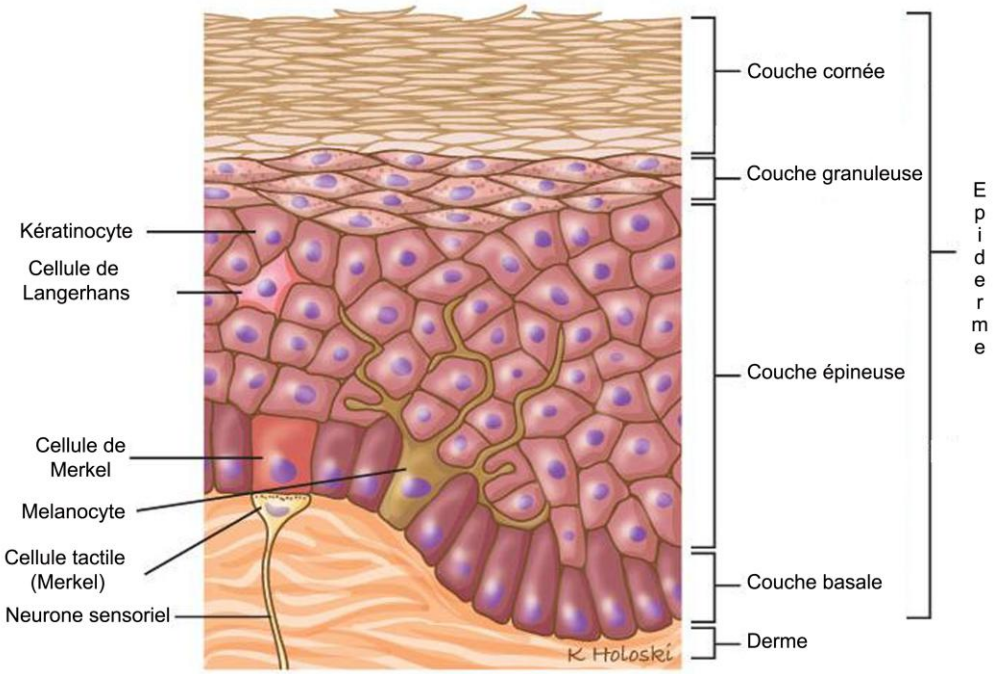


Figure 18 : Composition et organisation de l'épiderme *(d'après http://www.headandneckcancerguide.org). L'épiderme est composé de plusieurs couches de cellules contenant principalement des kératinocytes. La couche basale est la couche la plus profonde, à la jonction avec le derme. Cette couche contient des mélanocytes (brun), des cellules souches kératinocytaires et des cellules de Merkel innervées par les terminaisons nerveuses sensorielles du derme. La couche épineuse contient des kératinocytes et des cellules de Langerhans, la couche granuleuse contient des kératinocytes en dégénérescence et la couche cornée contient des cellules mortes éliminées par desquamation.*

2.2.3. La composition cellulaire de l'épiderme

L'épiderme est composé de nombreux types cellulaires provenant de différents lignages embryonnaires. Les kératinocytes sont les cellules majoritaires de l'épiderme, dérivant de l'ectoderme. Elles composent les quatre couches de l'épiderme sous une forme plus ou moins différenciée (fig.18).

Les cellules de Merkel sont des cellules neuro-épithéliales dérivant des cellules des crêtes neurales. Elles sont localisées dans la couche basale de l'épiderme et sont associées aux terminaisons nerveuses des neurones sensoriels du derme (fig.15). L'association de plusieurs cellules de Merkel avec les terminaisons nerveuses d'un seul neurone forme une structure nommée « dôme tactile». Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs sensitifs permettant de transmettre la sensation du toucher au système nerveux (Tadeu and Horsley, 2014).

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques du système immunitaire dérivant des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés, notamment dans l'épiderme. Ce sont les sentinelles du système immunitaire, capables de phagocyter les antigènes auxquels la peau est soumise (bactéries, virus, parasites..). Ces cellules possèdent des molécules du CMH de classe II leur permettant de présenter les antigènes phagocytés à leur surface. Une fois activées par un antigène, ces cellules migrent dans les ganglions lymphatiques satellites et présentent leur antigène aux lymphocytes T, déclenchant ainsi la réponse immunitaire acquise (Malissen et al., 2014; Tay et al., 2014) .

Les mélanocytes que nous avons décris plus précisément, sont les cellules pigmentaires de l'épiderme se trouvant dans la couche basale de l'épiderme (fig.18) et dans le follicule pileux. Elles dérivent des cellules des crêtes neurales (Rawles, 1947; Baroffio et al., 1988).

2.2.4. Le mélanocyte dans son environnement cellulaire

Les mélanocytes sont des cellules dispersées dans l'épiderme qui sont en contact permanent avec d'autres types cellulaires (kératinocytes, fibroblastes ou terminaisons nerveuses) capables de réguler les fonctions des mélanocytes (fig.18). Nous avons décrit précédemment que l'environnement cellulaire du mélanocyte est capable d'influer sur sa production de pigments (cf. 2.1.2), mais cet environnement est aussi capable de réguler d'autres fonctions du mélanocyte. Il a été montré que la sécrétion de DKK1 (dicckopf1), un inhibiteur de la voie WNT, par les fibroblastes dermaux inhibe la prolifération des mélanocytes (Yamaguchi et al., 2004, 2008). La présence de kératinocytes favorise la prolifération, la migration et la formation de dendrites chez les mélanocytes dans des modèles de peau reconstruite (Hirobe, 2005). Ainsi, les fibroblastes et les kératinocytes, par la sécrétion de certains facteurs de manière autocrine ou paracrine peuvent influer sur la différenciation, la prolifération et la

survie des mélanocytes mais aussi sur la quantité de mélanine produite et donc sur la coloration de la peau (Duval et al., 2002, 2014; Imokawa, 2004). De plus, il a été montré que dans l'épiderme, certains mélanocytes sont au contact des terminaisons nerveuses sensitives du « dôme tactile », suggérant la présence d'une communication synaptique (Hara et al., 1996; Chateau and Misery, 2004). L'application de neuropeptides sur des mélanocytes *in vitro* stimule la prolifération, la pigmentation et la longueur des dendrites des mélanocytes (Toyoda et al., 1999). Cependant, malgré la réponse des mélanocytes aux stimulations neuropeptidiques, un doute subsiste encore sur l'existence éventuelle de synapses chimiques entre les mélanocytes et les terminaisons nerveuses (Chateau and Misery, 2004). Ces résultats sont à prendre en considération lors de greffes de peau dans certaines maladies pigmentaires ou chez les grands brûlés. De nombreuses études ont montré que la greffe de mélanocytes seuls est beaucoup moins efficace que la greffe de peau contenant mélanocytes et kératinocytes, ou de façon plus surprenante, mélanocytes et cellules souches dérivées des adipocytes (Lim et al., 2014). Ainsi, les facteurs produits par les cellules non mélanocytaires de l'épiderme régulent des fonctions essentielles du mélanocyte comme la prolifération, la survie ou encore l'homéostase des mélanocytes. L'étude des fonctions des mélanocytes nécessite donc l'utilisation de modèles de co-culture ou de peaux reconstruites afin d'être au plus proche de la réalité *in vivo*.

2.3. L'homéostase de la peau

2.3.1. La localisation des cellules souches dans la peau

La peau est un organe pluricellulaire en constant renouvellement soumis régulièrement aux stress environnementaux et aux blessures. Il contient de nombreux types de cellules souches (fig.19) lui permettant de se régénérer efficacement (Goldstein and Horsley, 2012; Tadeu and Horsley, 2014). Les cellules souches sont toujours localisées dans une niche qui est un environnement cellulaire et moléculaire particulier, nécessaire pour les maintenir dans cet état quiescent et indifférencié les caractérisant (Osawa et al., 2005).

Les cellules souches présentes dans l'épiderme sont :

- des cellules souches kératinocytaires se trouvant dans la couche basale de l'épiderme, responsables du renouvèlement des kératinocytes (Tumbar et al., 2004),
- des cellules souches de Merkel au niveau du dôme tactile (Van Keymeulen et al., 2009; Morrison et al., 2009),
- des cellules souches sébocytaires dans la glande sébacée *(*Tadeu and Horsley, 2014),
- des cellules souches kératinocytaires et mélanocytaires dans le bulge du follicule pileux (Nishimura et al., 2002; Blanpain et al., 2004),
- des cellules souches myoépithéliales (Lu et al., 2012) et mélanocytaires (Okamoto et al., 2014) dans la glande sudoripare,
- des cellules souches mélanocytaires (MSC) dans l'épiderme interfolliculaire (Glover et al., 2015).

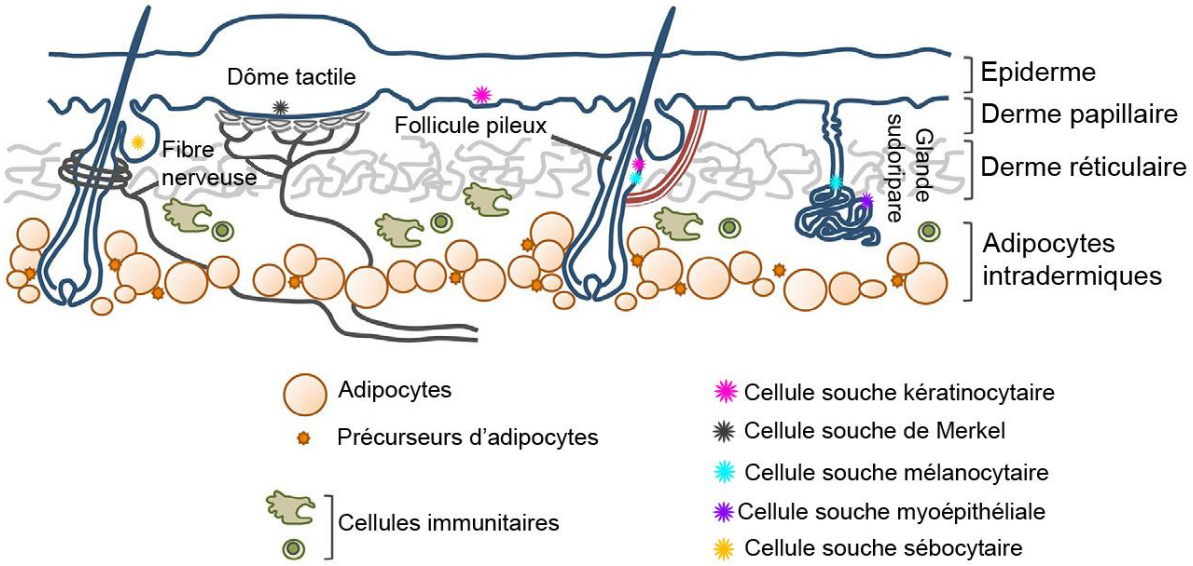


Figure 19 : Les cellules souches épidermiques *(Adapté de* Tadeu and Horsley, 2014). *Les cellules souches de la peau se trouvent dans l'épiderme ou les annexes épidermiques : les cellules souches kératinocytaires (rose), mélanocytaires (bleu), de Merkel (noire), myoépithéliales (violet) ou sébocytaire (jaune). Les cellules souches mélanocytaires interfolliculaires ne sont pas représentées sur ce schéma, car elles n'ont pas encore été localisées précisément.*

2.3.2. Les cellules souches mélanocytaires chez les mammifères

2.3.2.a Les MSC du follicule pileux

Le bulge du follicule pileux (fig.20) contient des cellules souches mélanocytaires, responsables de la pigmentation du poil et des cellules souches kératinocytaires responsables de la formation et la croissance du poil (Nishimura et al., 2002; Blanpain et al., 2004; Nishimura, 2011). La croissance du poil a lieu selon un cycle bien défini : anagène (phase de croissance), catagène (phase de dégénérescence) et télogène (phase de pause) (Hsu et al., 2014). Chez la souris, la première pigmentation après la naissance est due aux mélanoblastes ayant migrés dans l'épiderme puis dans le futur follicule pileux tandis que la pigmentation suivante est due à la différenciation des MSC du bulge (Hsu et al., 2014).

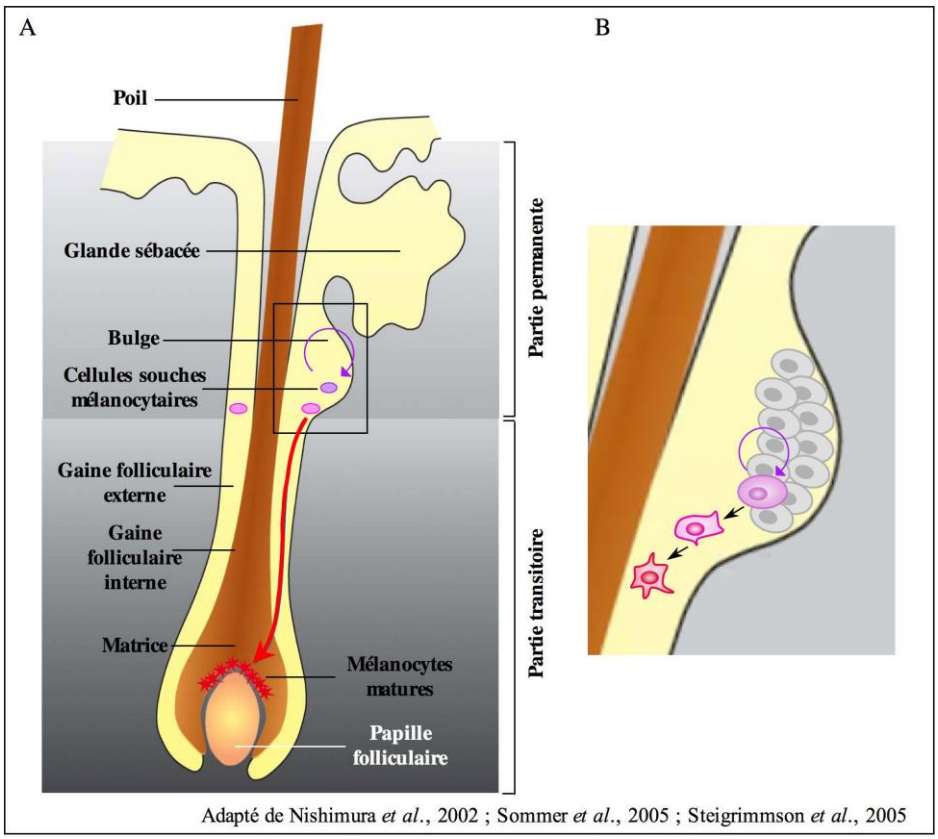


Figure 20: Cellules souches mélanocytaires du follicule pileux. *Les cellules souches mélanocytaire (MSC) sont localisées dans le bulge du follicule pileux de la peau adulte (A). (B) Dans le bulge, les MSC (grises) prolifèrent pour se renouveler (flèche violette) et donner naissance à des TAC (transient amplifying cell, rose). Les TAC vont migrer hors du bulge (flèche rouge en A) pour atteindre la papille dermique. Elles se diviseront et se différencieront en mélanocyte au cours de leur migration. Les mélanocytes matures de la papille dermique produisent les pigments du poil.*

2.3.2.b Le renouvellement des mélanocytes de l'épiderme

Malgré l'identification de plusieurs niches de MSC, les cellules souches et les mécanismes responsables du renouvellement des mélanocytes de l'épiderme n'ont pas été définis de façon certaine (Nishimura et al., 2002; Okamoto et al., 2014; Glover et al., 2015).

La première hypothèse désigne les MSCs du follicule pileux (fig.20) comme seuls responsables du renouvellement des mélanocytes de l'épiderme. Dans le cas d'une blessure superficielle chez l'humain, les mélanocytes du follicule pileux peuvent migrer dans l'épiderme pour repigmenter la zone lésée (Ortonne and Benedetto, 1981). Chez les patients atteints de Vitiligo, souffrant de dépigmentation progressive de la peau, une repigmentation à partir du poil est souvent observée (Arrunátegui et al., 1994; Yamaguchi and Hearing, 2014). Cependant, nous ignorons si ces échanges entre les compartiments épidermiques et folliculaires ont uniquement lieu lors d'une situation anormale, telle qu'une blessure ou une dépigmentation, ou s'ils se produisent régulièrement. Chez la souris, ce sont les MSC du follicule pileux qui sont majoritairement responsables de la pigmentation et de l'homéostase

des mélanocytes (Nishimura et al., 2002). En revanche, l'humain possède moins de follicules pileux que la souris donc les MSC responsables de l'homéostase des mélanocytes de l'épiderme peuvent être différentes.

La seconde hypothèse est qu'une autre niche que celle du bulge est responsable du renouvellement des mélanocytes de l'épiderme. L'une des observations étayant cette hypothèse se base sur le phénomène de blanchiment des poils (canitie). Au cours du vieillissement, la canitie est due à l'épuisement des MSCs du bulge du follicule pileux correspondant (Nishimura et al., 2005). Cependant, contrairement à ces poils ou cheveux blancs, la peau se situant autour est toujours pigmentée. Des études récentes ont découvertes deux autres niches de MSC dans les glandes sudoripares et l'épiderme interfolliculaire chez la souris et chez l'Homme (fig.19) (Okamoto et al., 2014; Jang et al., 2014; Glover et al., 2015). Ces deux niches peuvent être impliquées dans le renouvellement des mélanocytes de l'épiderme. Chez des souris mutantes dépourvues de poils ($Eda^{Ta/Y}$) une population de mélanocytes pigmentés est maintenue au niveau de l'épiderme interfolliculaire des pattes et de la queue (Glover et al., 2015). Chez ces souris sans poils et chez l'Homme, une population résidente de mélanocytes amélanotiques pouvant être des MSC, a été mise en évidence dans l'épiderme interfolliculaire (Grichnik et al., 1996; Glover et al., 2015). Ainsi dans les zones dépourvues de poils, la pigmentation de l'épiderme serait indépendante des MSC du follicule pileux.

La peau dispose donc de trois sources possibles de MSC : le follicule pileux, l'épiderme interfolliculaire et les glandes sudoripares. Cependant, des recherches sont encore nécessaires afin de déterminer le rôle particulier de chacune de ces niches et les effecteurs moléculaires impliqués dans l'homéostase des mélanocytes de l'épiderme.

3. LE VITILIGO, PATHOLOGIE DUE À LA DISPARITION DES MÉLANOCYTES

Après s'être intéressés à l'origine puis aux fonctions des mélanocytes de la peau, nous allons décrire dans cette troisième partie une pathologie pigmentaire causée par la perte des mélanocytes : le Vitiligo.

3.1. Description

3.1.1. La prévalence et les caractéristiques cliniques

Le Vitiligo est la pathologie pigmentaire la plus répandue avec une prévalence entre 0,5% et 2% dans le monde (Krüger and Schallreuter, 2012). Elle est caractérisée par l'apparition progressive de zones dépigmentées au cours du temps (fig.21) dues à la disparition totale ou partielle des mélanocytes (Le Poole et al., 1993; Tobin et al., 2000). Cette maladie se déclare le plus souvent à l'adolescence ou chez le jeune adulte et sa progression est imprévisible. Il existe plusieurs types de Vitiligo (Taïeb et al., 2007). Le Vitiligo non segmentaire (VNS) se développe sur l'ensemble du corps souvent de façon symétrique (fig. 21A). Le Vitiligo segmentaire (VS), plus rare, se développe de façon non symétrique au niveau de dermatome qui est un territoire cutané innervé par une racine nerveuse (fig. 21B). Le Vitiligo ne menace pas directement la vie des patients mais il a des conséquences dramatiques sur la vie sociale et professionnelle des patients (Yaghoobi et al., 2011).



Figure 21 : Patients atteints de Vitiligo non segmentaire (A) et segmentaire (B) *(Dr. Y. Gauthier) (A) Patient atteint de Vitiligo non segmentaire avec dépigmentation de la face, du tronc et des mains. (B) Patient atteint de Vitiligo segmentaire du tronc.*

3.1.2. Phénomène de Koebner

La progression de la pathologie du Vitiligo s'effectue suivant des zones bien définies et de manière similaire chez tous les patients. Les zones le plus rapidement touchées par une dépigmentation sont les parties de l'organisme soumises à des traumatismes fréquents. Le

phénomène de Koebner est un phénomène touchant les patients atteints de maladies cutanées qui stipule que les lésions cutanées se manifestent préférentiellement aux endroits subissant un traumatisme (fig.22) (Köbner, 1876; Weiss et al., 2002). Ce phénomène apparaît dans le cas de nombreuses pathologies cutanées dont le Vitiligo, le psoriasis et le lichen planus. Les traumatismes déclenchant la lésion cutanée peuvent être de différents types : physique (blessure et grattement), mécanique (frictions), chimique / thermique (brûlures, coups de soleil), réaction allergique ou irritante (tatouage, vaccination), pression chronique, inflammation ou encore des agents thérapeutiques (radiothérapie, chimiothérapie) (van Geel et al., 2011). Dans le cas du Vitiligo, le phénomène de Koebner a été observé chez 21% à 62% des patients selon les études (Barona et al., 1995; Mazereeuw-Hautier et al., 2010; Ezzedine et al., 2011). Les sites typiques pour ce phénomène sont évidemment les zones les plus exposées aux blessures telles que : mains, avant-bras, mollets, visage ainsi que les endroits classiquement touchés par le Vitiligo : genoux, doigts, coudes (fig.21) (van Geel et al., 2011).

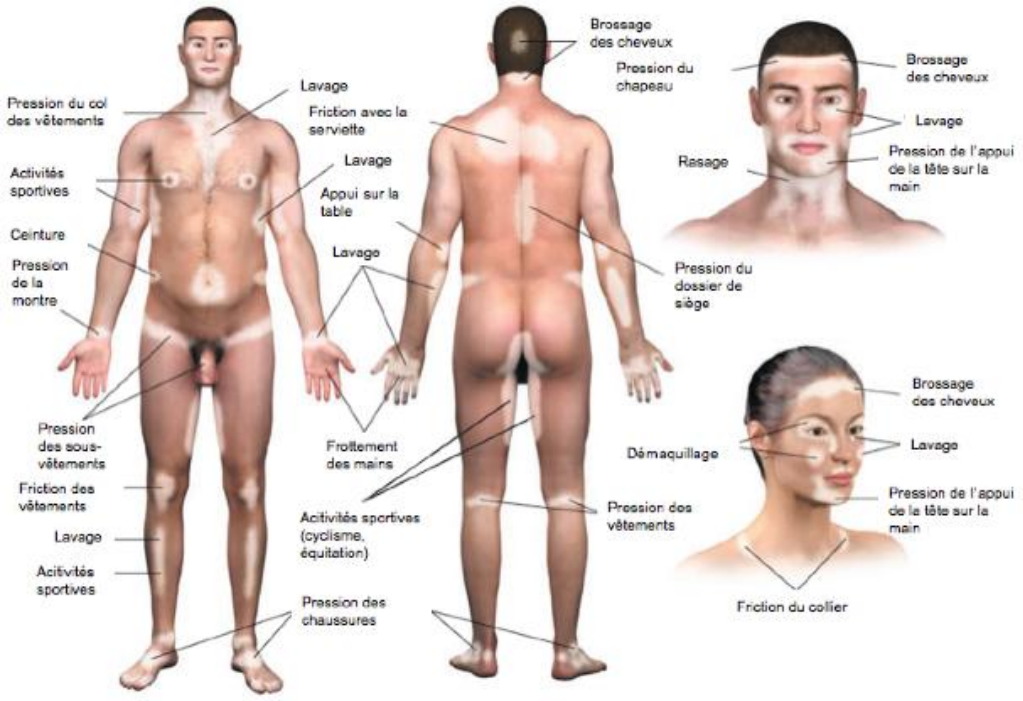


Figure 22 : Les dépigmentations pouvant être causées par le phénomène de Koebner *(Taïeb and Picardo, 2009). Une dépigmentation (blanc) peut apparaître chez les patients atteints de Vitiligo dans les zones soumises aux frictions quotidiennes.*

3.2. Les origines et l'étiologie de la maladie

Le Vitiligo est une pathologie multifactorielle et polygénique induisant inévitablement la réduction, voire la perte totale des mélanocytes de l'épiderme. Cette disparition peut avoir lieu par nécrose ou apoptose (Huang et al., 2002; Ruiz-Argüelles et al., 2007). Plusieurs théories ont été formulées pour expliquer cette perte des mélanocytes, mais aucune

pathogenèse précise ne peut encore l'expliquer entièrement (Schallreuter et al., 2008b; Boissy and Spritz, 2009).

3.2.1. Des prédispositions génétiques

Le Vitiligo est une pathologie présentant une composante génétique, il existe des cas de Vitiligo familiaux avec transmission non mendélienne (Birlea et al., 2008; Spritz, 2013). Cette pathologie a également été constatée chez des jumeaux monozygotes (Mohr, 1951; Yaghoobi et al., 2011). Bien que, dans le cas des jumeaux monozygotes, la prévalence est seulement de 23% suggérant l'implication de facteurs non génétiques (Alkhateeb et al., 2003).

Des analyses génomiques des patients atteints de Vitiligo ont permis de mettre en évidence des gènes de susceptibilités, des SNPs (single-nucleotide polymorphisms) tandis que les analyses transcriptomiques ont associé des variants de miARN au développement de cette pathologie (Spritz, 2008; Boissy and Spritz, 2009).

Les gènes dans lesquels des variants ont été mis en évidence font partie de différentes catégories (Spritz, 2013). La majorité, 90% de ces gènes font partis du système immunitaire dont : *Hla*, *Ptpn22, Nlrp1, Lpp, Il2ra, Ubash3a, Rere, Foxp3* (forkhead box P3), etc… (Jin et al., 2010, 2012). Les 10% restant sont exprimés par le mélanocyte et sont impliqués dans :

- la pigmentation : *Tyrosinase* (Jin et al., 2010), *Kit-l* (Birlea et al., 2008), *Oca2* (ocular albinism A2), *Mc1r* (Jin et al., 2012) et *miR-196a-2* qui régule l'expression de *Tyrp1* (Huang et al., 2013),
- l'élimination de dérivés oxydatifs : *Catalase* (Casp et al., 2002; Lu et al., 2014) ,
- l'adhésion : le gène *Smoc2* impliqué dans l'adhésion dépendant du calcium avec la matrice extracellulaire (Birlea et al., 2010; Alkhateeb et al., 2010, 2013) et *Ddr1* responsable de l'attachement à la lame basale (Kim et al., 2010; Silva de Castro et al., 2010),
- le développement des mélanocytes : *FoxD3* (Alkhateeb et al., 2005).

Suivant les approches utilisées pour les études génomiques, les résultats peuvent diverger, cette liste n'est donc pas exhaustive et ici sont listés uniquement les gènes ayant été mis en évidence dans plusieurs études (Spritz, 2013).

3.2.2. Les implications du système immunitaire

3.2.2.a Les maladies auto-immunes associées

Le Vitiligo a longtemps été considéré et étudié comme une maladie auto-immune. Le classement du Vitiligo dans les maladies auto-immunes est justifié par son développement concomitant à d'autres maladies immunitaires comme les maladies de la thyroïde (syndrome d'Hashimoto) dont la fréquence d'association avec le Vitiligo est de 20%, ou encore mais à une fréquence moindre, à la maladie d'Addison, au lupus, à une anémie ou à la maladie de

Bowel. La fréquence de ces maladies auto-immunes dans la famille proche de degré 1 des patients atteints de Vitiligo est également plus élevée que dans le reste de la population, plus du double pour la majorité de ces pathologies (Schallreuter et al., 1994a; Alkhateeb et al., 2003; Laberge et al., 2005; Birlea et al., 2008). Des études récentes ont montré que malgré le rôle manifeste du système immunitaire, les patients atteints de vitiligo présentent également des dérèglements métaboliques, oxydatifs et biochimiques ayant un rôle prépondérant dans l'étiologie de cette pathologie. Les hypothèses actuelles sur la pathogénie qui tentent de réconcilier toutes les évidences biologiques supposent que le système immunitaire agit comme un facteur aggravant de cette pathologie. Ainsi le système immunitaire serait impliqué dans la progression et la chronicité du Vitiligo plutôt que dans sa genèse (Namazi, 2007; Westerhof and d'Ischia, 2007; Glassman, 2011; Spritz, 2013).

3.2.2.b Un dérèglement immunitaire

Il a été montré qu'environ 30% des patients atteints de Vitiligo, présentent dans leur sang et au niveau des lésions dépigmentées des anticorps dirigés contre les mélanocytes (Harning et al., 1991; Farrokhi et al., 2005; Ruiz-Argüelles et al., 2007). Ces anticorps sont capables d'induire l'apoptose des mélanocytes en culture et leur quantité serait corrélée à la progression de la pathologie (Ruiz-Argüelles et al., 2007). Ainsi, les patients avec un Vitiligo « actif » présentent des anticorps de façon quasi systématique et en quantité plus élevée que les patients ayant un Vitiligo dit « inactif » ou « stable » (Harning et al., 1991). Les patients atteints de Vitiligo ont aussi un taux plus élevé de cytokines pro-inflammatoires, activatrices du système immunitaires tels IL-10, TNF-α (tumor necrosis factor alpha) et IFN-δ (interféron gamma) au niveau de l'épiderme péri-lésionnel (Grimes et al., 2004). Cependant, cette quantité de cytokine est variable selon les études et la localisation des échantillons (peau ou sang) (Glassman, 2011; Sandoval-Cruz et al., 2011). Les cytokines attirent par chimiotactisme les médiateurs de l'immunité acquise, les lymphocytes B et les lymphocytes T, sur le site de l'inflammation (fig.23). Ainsi, la présence d'infiltrat de lymphocytes T (CD4 et CD8) cytotoxiques et *helper* au niveau des zones péri-lésionnelles et lésionnelles a été mise en évidence (van den Wijngaard et al., 2000; Le Poole et al., 2004). Ces lymphocytes T sont souvent juxtaposés aux mélanocytes dans ces zones, suggérant un effet cytotoxique de ces lymphocytes envers les mélanocytes (Le Poole et al., 2004). En revanche, il semblerait que la quantité des lymphocytes B produisant les anticorps soit normale contrairement à celle des lymphocytes T, très élevée dans le sang des patients (Pichler et al., 2009).

La présence de ces lymphocytes T et d'anticorps dirigés contre les mélanocytes est due à la reconnaissance d'antigène mélanocytaire par ces cellules (Campbell et al., 2008). Les cellules du système immunitaire ne devraient pas avoir une réponse dirigée contre l'organisme. Cependant, lors d'une mort cellulaire par nécrose ou apoptose, les cellules dendritiques comme les cellules de Langerhans qui phagocytent la cellule morte peuvent être activées par les antigènes de cette cellule (Fenton, 2015). Ainsi, la mort par apoptose ou nécrose des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo pourrait activer une réponse immune (fig.23)

(Westerhof and d'Ischia, 2007; Laddha et al., 2013). Une autre possibilité est que dans un contexte pathologique, les mélanocytes possédant des protéines CMH de classe II pouvant présenter un antigène au lymphocyte T, présentent par erreur des protéines mélanosomales aux lymphocytes T (Overwijk and Restifo, 2000; Le Poole et al., 2004).

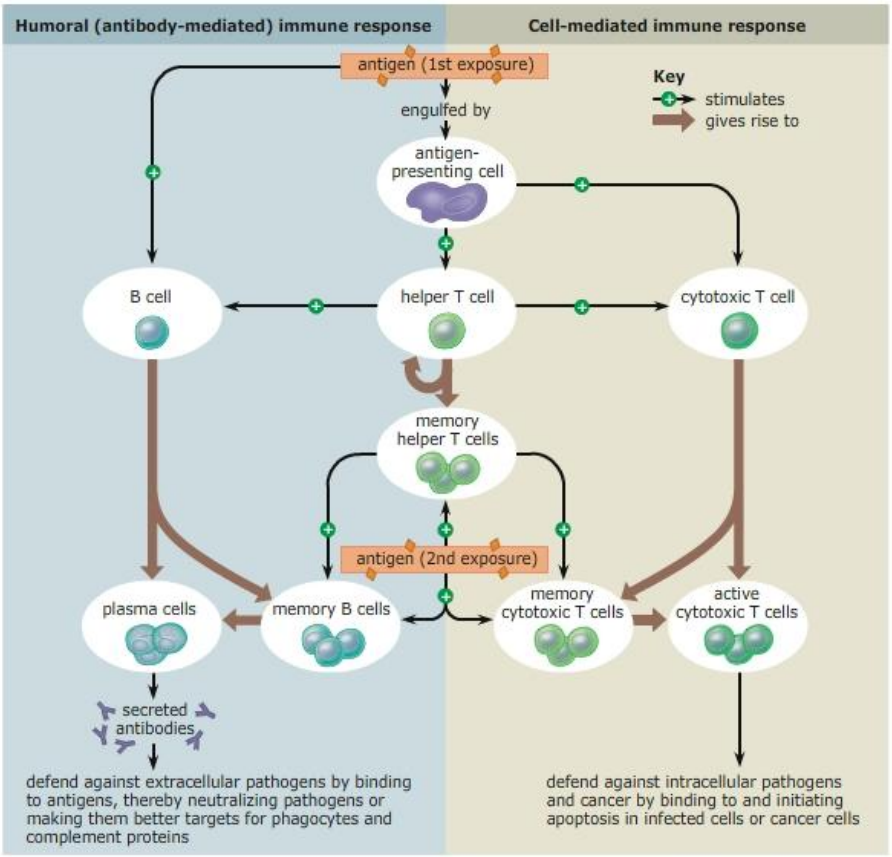


Figure 23 : La réponse immunitaire acquise. *Des antigènes (bactéries, virus ou reste de cellule apoptotique) sont phagocytés par les cellules présentatrices d'antigènes (violet) comme les cellules de Langerhans de l'épiderme. Ces cellules vont présenter des antigènes aux lymphocytes T helper (vert) des ganglions lymphatiques qui vont activer les lymphocytes B (bleu), responsables de la production des anticorps et les lymphocytes T (vert), responsables de la destruction des cellules infectées. La réponse immune acquise est enclenchée.*

3.2.3. Un désordre biochimique, neuropeptidique et oxydatif

3.2.3.a Le désordre biochimique et neuropeptidique

Les patients atteints de Vitiligo présentent un excès d'activité enzymatique de la GTP-cyclohydrolase I qui induit une accumulation dans l'épiderme de 6-tétrahydroptérine (6-BH4), un cofacteur de la mélanogenèse (fig.15). Cette accumulation de 6-BH4 va induire la production de 7-tetrahydropterin (7-BH4) servant de substrat pour la production de catécholamines et de norépinephrine par les kératinocytes (Schallreuter et al., 1994b, 1994c).

Une quantité élevée de neurotransmetteurs (NORADRENALINE, NOREPINEPHRINE, EPINEPHRINE …) et de catécholamine est présente au niveau de la peau et dans l'urine des patients (Morrone et al., 1992; Schallreuter et al., 1996; Cucchi et al., 2000). L'augmentation de ces neurotransmetteurs peut également être due à une synthèse anormale par les terminaisons nerveuses cutanées au niveau des synapses chimiques cutanées (Namazi, 2007). Une accumulation de NEUROPEPTIDE-Y proches des fibres nerveuses de la peau a été mise en évidence chez les patients atteints de Vitiligo (Al'Abadie et al., 1994; Lazarova et al., 2000). La peau pigmentée des patients présente également plus de fibres nerveuses périphériques cutanées de type CGRP-IR (calcitonin gene-related peptide immunoreactive) et NGFr-IR (nerve growth factor receptor immunoreactive) que la peau des patients contrôles (Liu et al., 1996). La synthèse des neuropeptides peut aussi être affectée par le stress : la synthèse, entre autres, d'EPINEPHRINE et de NOREPINEPHRINE est augmentée par l'anxiété (Carrasco and Van de Kar, 2003). Les patients atteints de Vitiligo sont souvent sujets à l'anxiété du fait de leur maladie. Or, il a été montré que le stress est un facteur aggravant dans la progression de la maladie (Al'Abadie et al., 1994b; Manolache and Benea, 2007; Yu et al., 2012). Certains mélanocytes dans l'épiderme sont localisés au niveau des fibres nerveuses sensitives *in vivo* et sont capables de répondre à une stimulation neuropeptidique *in vitro* (Hara et al., 1996; Toyoda et al., 1999). Les mélanocytes pourraient donc être affectés par cette augmentation de neuropeptides. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre et montrer ce dérèglement de la synthèse de neuropeptides par les terminaisons nerveuses cutanées, et les effets sur les mélanocytes de la peau ainsi que sur la progression de cette pathologie.

Cette présence anormalement élevée de neurotransmetteurs ou de catécholamines serait toxique pour les mélanocytes mais surtout elle serait à l'origine de la production de molécules oxydantes (fig.24) dont le péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Le Poole et al., 1994; Schallreuter et al., 1996; Denat et al., 2014). Les catécholamines et les quinones peuvent aussi empêcher la production correcte de pigment, les catécholamines peuvent servir de substrat à la TYROSINASE et ainsi entrer en compétition avec la TYROSINE , les o-quinones peuvent aussi inactiver la TYROSINASE (Westerhof and d'Ischia, 2007). Ainsi, ces désordres biochimiques, associés à d'autres facteurs, peuvent inhiber la synthèse de pigment mais aussi participer à la destruction du mélanocyte et à la progression de cette pathologie.

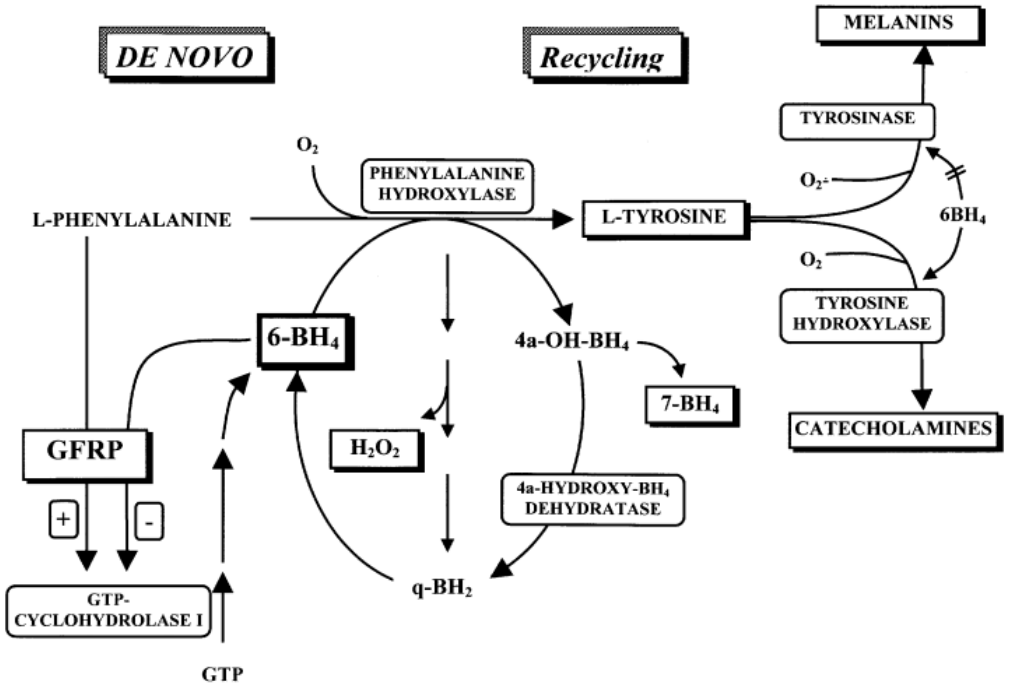


Figure 24: Réactions enzymatiques intracellulaires conduisant à la production de catécholamines et d'H_2O_2 *(Schallreuter et al., 2001). Un excès d'activité de la GTP-CYCLOHYDROLASE I dans le mélanocyte conduit à la production de dérivés métaboliques comme le 6-BH4 et le 7-BH4 induisant la production de dérivés toxiques comme les catécholamines ou l'H_2O_2.*

3.2.3.a Une balance oxydative perturbée

Au cours de certains processus intracellulaires biochimiques comme la respiration ou la synthèse de mélanine, la cellule produit naturellement des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui sont toxiques s'ils ne sont pas éliminés. Les ROS classiquement produits sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyde ($HO^{\cdot}$). Ces ROS lorsqu'ils s'accumulent, peuvent causer des dommages à l'ADN, aux protéines, induire une péroxydation des membranes lipidiques et ultimement provoquer la mort cellulaire (Fruehauf and Meyskens, 2007). Pour éviter les dommages et maintenir l'intégrité cellulaire, la cellule possède des enzymes anti-oxydantes capables de métaboliser les ROS pour les transformer en dérivés moins dangereux (fig.25). Les enzymes anti-oxydantes sont : la CATALASE, la SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) et la GLUTATHIONNE PEROXIDASE (GP) (Glassman, 2011). Un dysfonctionnement de la production ou de l'activité catalytique de ces enzymes anti-oxydantes crée un environnement oxydatif délétère pour les cellules.

Les patients atteints de Vitiligo présentent une balance oxydative perturbée dans les compartiments sanguin et épidermal. Des études montrent une concentration forte, de l'ordre de $10^{-2}/10^{-3}$M, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans l'épiderme des patients (Schallreuter et al., 1999, 2001). L'augmentation de l'H_2O_2 chez ces patients, est associée à une augmentation de l'activité de la SOD, enzyme responsable de sa production, dans l'épiderme et les cellules

sanguines (Chakraborty et al., 1996; Agrawal et al., 2004; Hazneci et al., 2005; Ines et al., 2006; Dammak et al., 2009; Jain et al., 2011). Par ailleurs, une diminution de l'activité enzymatique de la CATALASE, responsable de l'élimination de l'H_2O_2, est observée dans l'épiderme et les mélanocytes en culture provenant des patients (Maresca et al., 1997; Passi et al., 1998; Dammak et al., 2009). L'activité d'autres enzymes responsables de l'élimination de ROS, comme la GR est également diminuée à la fois dans l'épiderme et dans le sang des patients (Passi et al., 1998; Agrawal et al., 2004; Briganti et al., 2012). L'activité des enzymes du cycle de Krebs dans les mitochondries est altérée dans les cellules sanguines des patients, induisant une augmentation de ROS (Dell'Anna et al., 2003). Ainsi, les patients présentent une déficience de l'activité enzymatique anti-oxydante cellulaire systémique, induisant la production d'une quantité élevée de ROS, dont l'H_2O_2, dans l'organisme.

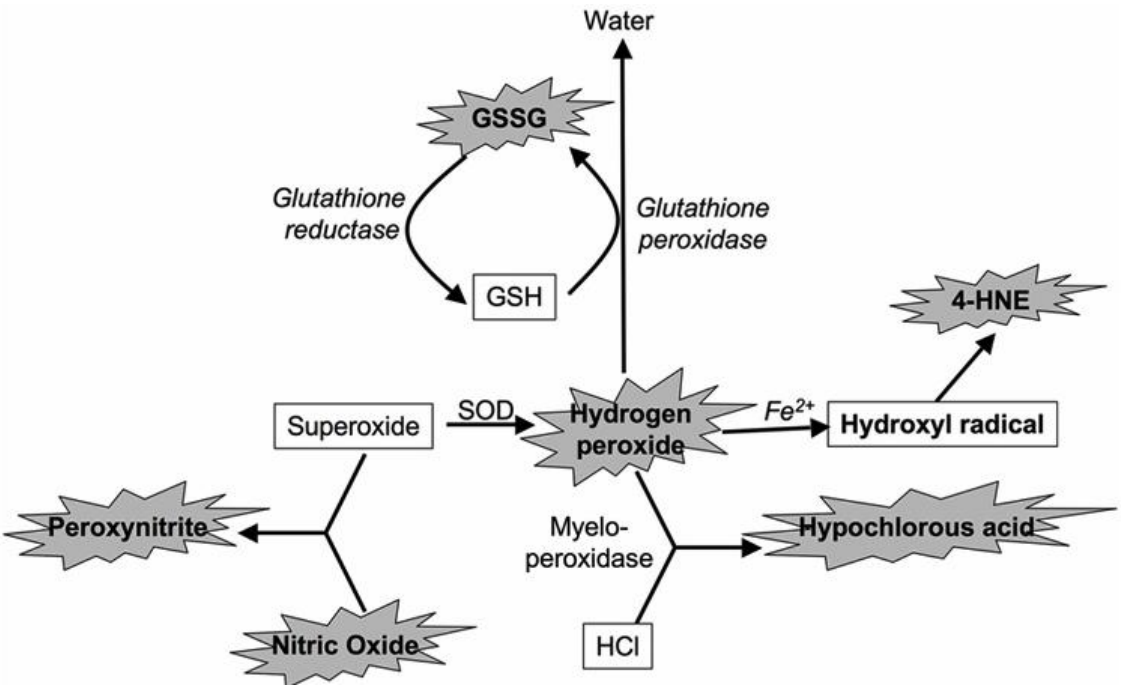


Figure 25 : Production et élimination des différents dérivés réactifs de l'oxygène *(Glassman, 2011). Le peroxyde d'hydrogène est produit par l'activité enzymatique de la SOD lors de la métabolisation de l'ion superoxide. Le peroxyde d'hydrogène peut être ensuite éliminé par l'action de deux enzymes : la gluthathione péroxidase ou la myéloperoxydase pour former de l'eau ou de l'acide hypochlorique.*

3.2.3.c Les effets du stress oxydatif sur les mélanocytes

Une augmentation de ROS dans l'organisme des patients atteints de Vitiligo va créer un environnement oxydatif délétère pour les cellules. Dans l'épiderme, les kératinocytes possèdent une activité enzymatique de la catalase, de la SOD et de la GP plus importante que celle des mélanocytes (Yohn et al., 1991). De plus, les kératinocytes sont capables d'évacuer les molécules oxydantes vers les mélanocytes, augmentant ainsi leur quantité intracellulaire de ROS (Pelle et al., 2005). Ainsi, les mélanocytes seraient plus exposés au stress oxydatif et capables d'éliminer moins efficacement les ROS que les kératinocytes. Chez les patients

Vitiligo, les mélanocytes ont une activité anti-oxydante de la CATALASE plus faible et sont plus sensibles aux traitements par des agents peroxidants *in vitro* que les mélanocytes contrôles (Maresca et al., 1997). Le stress oxydatif induit également une peroxydation de la membrane des mélanocytes de patients atteints de Vitiligo, rendant ces cellules plus sensibles à une stimulation apoptotique *in vitro* (Dell'Anna et al., 2007a). Enfin, les mélanocytes de patients atteints de Vitiligo exposés à un stress oxydatif *in vitro*, déclenchent l'apoptose contrairement aux mélanocytes contrôles (Jimbow et al., 2001). Ainsi, les mélanocytes des patients atteints de Vitiligo soumis à un stress oxydatif important, ne possèdent pas une activité enzymatique anti-oxydante suffisante pour éliminer ces dérivés oxydatifs. L'augmentation de ROS endommagerait la cellule de manière irréversible et le mélanocyte déclencherait l'apoptose.

La présence de ROS dans l'épiderme peut également induire la mort des mélanocytes de façon indirecte par l'activation du système immunitaire (Glassman, 2011; Yao et al., 2012). Les mélanocytes apoptotiques pourraient être reconnus comme antigènes et induire une réponse immunitaire acquise. Il a aussi été montré qu'un stress oxydatif peut activer la sécrétion par les mélanocytes de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Ces cytokines induisent l'activation des lymphocytes T et une réponse immune (fig.23) engendrant l'élimination des mélanocytes (Glassman, 2011; Yao et al., 2012).

3.2.4. La mélanocytorrhagie : un défaut d'adhésion des mélanocytes

3.2.4.a La théorie de la mélanocytorrhagie

Une théorie plus récente, « la mélanocytorrhagie » propose qu'un défaut d'adhésion des mélanocytes pourrait être à l'origine de leur disparition. Ce défaut d'adhésion, associé à un stress, induirait un détachement des mélanocytes de la lame basale. Ces mélanocytes subiraient ensuite une migration trans-épidermale, par le mouvement de renouvellement de l'épiderme et se retrouveraient dans les couches supérieures de l'épiderme. À terme, du fait du renouvellement continu de l'épiderme, le mélanocyte serait éliminé par desquamation. Le détachement massif des mélanocytes associé à leur non renouvellement, aboutirait à leur disparition et à la dépigmentation (Gauthier et al., 2003a, 2003b). Lorsque des modèles de peaux reconstruites contenant des kératinocytes normaux et des mélanocytes Vitiligo sont incubées avec de l'H_2O_2 ou des catécholamines ou encore du sérum de patients, un détachement des mélanocytes est observé (Cario-André et al., 2007). Cette étude montre que des facteurs externes présents dans le sang des patients induisent un détachement des mélanocytes.

3.2.4.b L'adhésion du mélanocyte à la lame basale

L'ancrage du mélanocyte dans l'épiderme a lieu de deux manières : un ancrage à la lame basale via les intégrines et une adhésion aux kératinocytes via les cadhérines (Tang et al., 1994; Pinon and Wehrle-Haller, 2011). Les intégrines, dont l' INTEGRINE-α6β1 permettent l'ancrage du mélanocyte à la matrice extra-cellulaire (MEC) (Pinon and Wehrle-Haller, 2011). Une internalisation de l'INTEGRINE-α6, suite à une stimulation UVB *in vitro*, induit un détachement puis l'apoptose des mélanocytes (Krengel et al., 2005). Cependant, des marquages immuno-histochimiques montrent que l'expression des intégrines n'est pas affectée dans la peau lésionnelle, périlesionelle et pigmentée chez les patients souffrant de Vitiligo par rapport à des contrôles sains (Le Poole et al., 1997; Bordignon et al., 2013).

DDR1 (Discoidin domain receptor 1) est un récepteur tyrosine kinase du collagène IV qui est aussi impliqué dans l'attachement des mélanocytes à la lame basale (Fukunaga-Kalabis et al., 2006; Ricard et al., 2012). Cette adhésion des mélanocytes via DDR1 est dépendante de la présence et de la localisation de son ligand, la protéine CCN3 (nephroblastoma overexpressed = NOV) (Fukunaga-Kalabis et al., 2006). CCN3 est une protéine sécrétée, exprimée par les kératinocytes de l'épiderme et présente dans la MEC du derme (Rittié et al., 2011). Une perturbation de l'expression des protéines DDR1 ou CCN3 induit une localisation non basale des mélanocytes en co-culture avec des kératinocytes (Fukunaga-Kalabis et al., 2006). Les mélanocytes surexprimant CCN3 ou n'exprimant plus DDR1, se trouvent soit dans les couches supérieures ou dans les couches inférieures du derme de ce modèle *in vitro* (Fukunaga-Kalabis et al., 2006). Les patients atteints de Vitiligo ont une expression de CCN3 et de DDR1 diminuée dans les zones lésionnelles par rapport aux zones péri-lésionnelles de la peau (Ricard et al., 2012). Une extinction de l'expression de CCN3 par shRNA dans des mélanocytes de peaux reconstruites diminue l'adhésion des mélanocytes au collagène IV et induit leur détachement de la lame basale (Ricard et al., 2012). Ainsi, les mélanocytes des patients pourraient présenter un défaut d'adhésion à la lame basale induisant leur détachement.

3.2.4.c L'adhésion du mélanocyte aux kératinocytes

Dans la peau, ce sont les cadhérines qui assurent majoritairement l'adhésion entre mélanocytes et kératinocytes. Les mélanocytes expriment différents types de cadhérines en fonction de leur localisation (fig.26). E-CADHÉRINE est exprimée par les cellules de l'épiderme et assure l'adhésion entre les kératinocytes et entre mélanocytes et kératinocytes (Tang et al., 1994). La protéine P-CADHÉRINE est exprimée uniquement par les cellules de la lame basale et sera localisée aux bordures latérales des cellules basales. Dans le follicule pileux, P-CADHÉRINE est majoritairement exprimé par les mélanocytes et les kératinocytes tandis que E-CADHÉRINE y est faiblement exprimé. Enfin dans le derme, c'est la N-CADHÉRINE qui est exprimée par les mélanocytes et les fibroblastes. β-CATÉNINE,

partenaire cytoplasmique des cadhérines, est exprimée par toutes les cellules de l'épiderme (Pla et al., 2001).

L'AQUAPORINE-3 (AQP3) est une protéine transmembranaire exprimée par les cellules de la lame basale de l'épiderme qui interagit directement avec E-CADHÉRINE (Nejsum and Nelson, 2007; Hara-Chikuma and Verkman, 2008; Kim and Lee, 2010). Dans la peau lésionnelle des patients atteints de Vitiligo, une baisse de l'expression de l'AQP3 est observée par rapport à la peau pigmentée (Kim and Lee, 2010). Cette baisse diminuerait la survie des kératinocytes en induisant une activation des protéines AKT et de PI3K, deux protéines impliquées dans la signalisation apoptotique (Maiese et al., 2012).

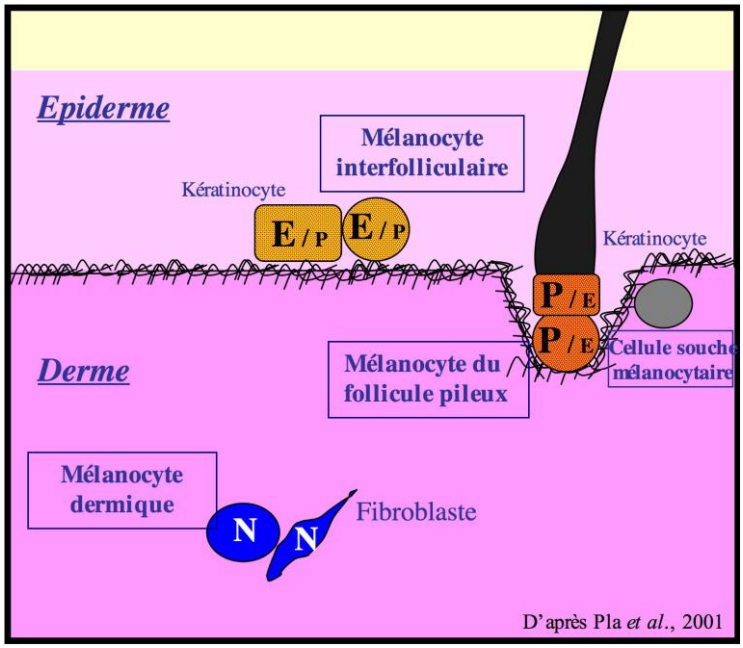


Figure 26 : Expression des cadhérines selon la localisation des mélanocytes dans la peau *(Adapté de Pla et al., 2001). E-CADHÉRINE est exprimé par les mélanocytes-kératinocytes de l'épiderme. Dans le follicule pileux P-CADHÉRINE est majoritairement exprimé par les mélanocytes et les kératinocytes. N-CADHÉRINE est exprimé par les mélanocytes et kératinocytes du derme.*

3.2.4.d La E-CADHÉRINE

La E-CADHÉRINE est une glycoprotéine de la superfamille des cadhérines exprimée par les cellules épithéliales. Dans cette superfamille, E-CADHÉRINE, N-CADHÉRINE et P-CADHÉRINE font partis des cadhérines classiques. La fonction principale de E-CADHÉRINE est la formation des jonctions adhérentes qui participent à de nombreuses fonctions cellulaires telles que : la morphogenèse des tissus, la reconnaissance cellulaire, la migration coordonnée des cellules et l'établissement de la polarité apico-basale au cours du développement (Halbleib and Nelson, 2006). La E-CADHÉRINE possède une partie membranaire responsable de l'ancrage à la membrane plasmique, une partie extracellulaire et une partie cytoplasmique. La partie extracellulaire est composée de cinq domaines répétés

(Extracellular Cadherin ou EC) qui permettent à la E-CADHÉRINE de s'homodimériser avec des protéines de la cellule adjacente, formant ainsi les jonctions adhérentes (fig.27). Cette homodimérisation est très fortement dépendante de la présence de calcium (Hartsock and Nelson, 2008; Niessen et al., 2011). Le domaine cytoplasmique de E-CADHÉRINE lui permet d'interagir avec β-CATÉNINE, son principal partenaire pouvant se fixer à la protéine α-CATÉNINE (fig.21). α-CATÉNINE permet l'ancrage au cytosquelette d'actine et la stabilisation de la jonction cellule-cellule (Halbleib and Nelson, 2006).

La fixation de certaines protéines au domaine cytoplasmique de E-CADHÉRINE permet la régulation dynamique du complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE en le stabilisant ou au contraire entrainant sa dissociation. Un clivage de la E-CADHÉRINE par la PRESENILIN-1 après un influx de calcium induit la désorganisation des jonctions adhérentes et le relargage de E-CADHÉRINE, β-CATÉNINE et α-CATÉNINE dans le cytoplasme (Marambaud et al., 2002). Au cours d'un stress oxydatif, une phosphorylation par la kinase SRC des protéines E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE va induire leur dissociation et une rupture des jonctions adhérentes (Owens et al., 2000). E-CADHÉRINE peut également être ubiquitinée par la E3-ubiquitine ligase HAKAI (Fujita et al., 2002). Cette ubiquitination de E-CADHÉRINE induit l'endocytose de E-CADHÉRINE, la dissociation des contacts cellulaires et active la motilité cellulaire (Fujita et al., 2002). Ainsi, la cellule possède différents mécanismes afin de réguler la stabilisation du complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE. Cette régulation du complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE va influer sur les jonctions cellulaires mais est également un moyen de réguler la voie WNT en permettant le relargage de β-CATÉNINE dans le cytoplasme (Heuberger and Birchmeier, 2010).

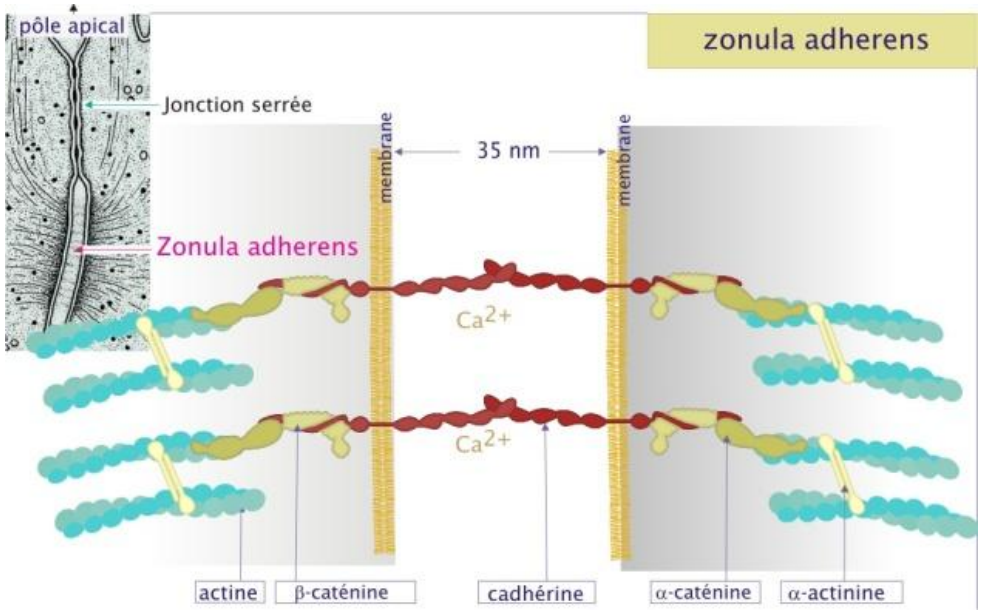


Figure 27 : Les protéines des jonctions adhérentes *(http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap3/co/Chap3_webUnisciel.html) Les CADHÉRINES (rouge) de deux cellules adjacentes s'homodimérisent d'une manière calcium dépendante. Les cadhérines interagissent avec des*

protéines β-CATÉNINE qui se lient à α-CATÉNINE, cette dernière permettant l'ancrage au cytosquelette d'actine.

3.3. Les thérapies

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement permettant de guérir du Vitiligo. La plupart des thérapies tendent à ralentir la progression de cette pathologie ou au contraire à l'accélérer lorsqu'elle est trop avancée. Dans le meilleur des cas, certaines thérapies peuvent aboutir à une re-pigmentation plus ou moins efficace et persistante (Felsten et al., 2011). Le but de toutes les thérapies dans cette pathologie est d'uniformiser la couleur de la peau et, selon ce critère, le camouflage des zones dépigmentées par du maquillage reste la meilleure « thérapie » (Ramien et al., 2014).

3.3.1. Les thérapies immuno-modulatrices

Les corticostéroïdes (CS), appliqués localement (crème), constituent le traitement classique de première ligne pour le Vitiligo. Une réponse est induite chez 64% à 90% des patients selon les études et la re-pigmentation mesurée est d'environ 50% lors d'une application locale (Lepe et al., 2003; Kwinter et al., 2007). Cependant, à cause des effets secondaires importants (atrophie de l'épiderme, infection bactérienne ou fongique, insomnie, hypertension, acné, gain de poids, etc..), ce type de traitement ne peut être administré à long terme mais sur une période courte et à une dose définie. Au niveau cellulaire, les corticostéroïdes permettent de réduire la réponse immunitaire et l'inflammation, empêchant par là, la destruction des mélanocytes (Felsten et al., 2011).

Les inhibiteurs de calcineurine appliqués localement permettent également de moduler la réponse immunitaire tout en présentant moins d'effets secondaires que les corticostéroïdes. La réponse au traitement est similaire à celle obtenue à l'aide des corticostéroides mais la repigmentation observée est plus variable : de 26 à 75% selon les études (Silverberg et al., 2004; Mayoral et al., 2007; Seirafi et al., 2007). La calcineurine est un facteur de transcription exprimé par les cellules du système immunitaire. Elle permet d'activer la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation telles les cytokines, comme IL-2 (Interleukin-2) ou encore TNF-α (tumor necrosis factor-alpha). L'utilisation des inhibiteurs permet de diminuer cette réponse inflammatoire chez les patients (Grimes et al., 2004).

Des analogues de la vitamine D3 peuvent également être prescrits en traitement local dans le cas du Vitiligo. Ils ont, comme les corticostéroides et les inhibiteurs de la calcineurine, des effets immunomodulateurs mais ils ont également un effet antiprolifératif sur les kératinocytes de l'épiderme. La réponse des patients est à raison de 55% à 78% des patients et la repigmentation varie de 30% à 100% (Parsad et al., 1999; Gargoom et al., 2004; Newman

and Silverberg, 2011). Les effets secondaires, moins importants que pour les deux thérapies précédentes, peuvent être : irritations, brûlures et érythème.

3.3.2. Les photothérapies

Les radiations ultraviolettes de type UVA et UVB stimulent la production de pigments par le mélanocyte. Ainsi, des thérapies utilisant les UVA / UVB seuls ou combinés avec des thérapies chimiques sont mises en place afin de stimuler la repigmentation (Felsten et al., 2011; Korobko, 2012) . Les thérapies par les UV nécessitent des traitements réguliers de longue durée (au moins un an) et les études sur l'efficacité au long terme de ces traitements indiquent que la repigmentation induite persiste de nombreuses années (Kenney, 1971; Wildfang et al., 1992). La PUVA (Psoralen UVA) est une thérapie associant une exposition aux UVA avec une prise de psoralène, un photosensibiliseur (Adişen et al., 2008; Mofty et al., 2013; El-Mofty et al., 2006). Cette thérapie est connue pour induire l'hypertrophie des mélanocytes (Ortonne et al., 1979). Cependant, certaines études montrent une corrélation entre le traitement PUVA et le développement de cancers de la peau, comme le carcinome basal ou à cellules squameuses, probablement dû à l'utilisation du psoralène (Park et al., 2003; Hearn et al., 2008; Kim et al., 2014). Les patients peuvent également être soumis à une thérapie utilisant un laser appelé monochromatic excimer laser (MEL) ou hélium néon (HeNe). Cette thérapie par laser est indiquée pour le traitement de zones bien spécifiques et limitées spatialement, donc plutôt dans le cas de Vitiligo segmentaire où les dépigmentations sont moins étendues (Felsten et al., 2011).

Certaines études proposent la combinaison de diverses molécules anti-oxydantes avec de la photothérapie afin d'augmenter l'efficacité de cette dernière (Elgoweini and Nour El Din, 2009; Soliman et al., 2015). La prise de molécules anti-oxydantes peut se faire sous forme systémique ou locale par application de crèmes contenant des enzymes anti-oxydantes comme la catalase ou la superoxide dismutase (Dell'Anna et al., 2007b).

3.3.3. La dépigmentation

Lorsque la pathologie est très avancée et que les thérapies de re-pigmentation ont échouées, une dépigmentation générale est alors proposée au patient afin d'uniformiser la couleur de sa peau. Classiquement, ce traitement se fera par l'application de monobenzone ou d'hydroquinone qui vont induire l'apoptose des mélanocytes (Grojean et al., 1982; Hariharan et al., 2010). Selon les études, entre 69% et 84% des patients répondent au traitement avec une dépigmentation plus ou moins complète. Ce traitement peut être complété par l'utilisation de laser QSR (Q switch ruby) pour minimiser les effets secondaires du traitement chimique seul. Il est possible d'observer une légère repigmentation par la suite chez certains patients (Mosher et al., 1977; Njoo et al., 2000).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

OBJECTIFS DE LA THÈSE :

Les mélanocytes sont les cellules pigmentaires de l'épiderme dont la fonction principale est la protection contre les dommages de l'ADN causés par les rayons UV. Cette protection est assurée par un pigment, la mélanine, que les mélanocytes produisent puis transfèrent aux kératinocytes adjacents. Une perte de la pigmentation induit des maladies pigmentaires qui diminuent la protection de la peau contre les dommages dus aux UV. Cette perte de la pigmentation peut être imputable à une perte des mélanocytes comme dans le Vitiligo. L'une des hypothèses pour la disparition des mélanocytes dans le Vitiligo est un défaut d'adhésion des mélanocytes ou mélanocytorrhagie. Ce défaut d'adhésion induit un détachement des mélanocytes de la lame basale puis leur élimination par migration trans-épidermique. L'adhésion entre mélanocytes et kératinocytes de l'épiderme est dépendante de la protéine E-CADHÉRINE. Ainsi, nous avons étudié les altérations éventuelles de l'expression et la distribution de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes, avant la disparition de ces derniers, c'est-à-dire au niveau de la peau pigmentée des patients atteints de Vitiligo. **Notre hypothèse est que les mélanocytes de l'épiderme pigmenté des patients atteints de Vitiligo auraient un défaut d'expression membranaire de la E-CADHÉRINE, ce qui favoriserait leur détachement de la lame basale.**

E-CADHÉRINE est exprimée par les mélanocytes de l'épiderme et les mélanoblastes à des stades tardifs. Afin de compléter notre étude sur le rôle de E-CADHÉRINE dans l'homéostase des mélanocytes chez l'adulte dans la pathologie du Vitiligo, nous avons décidé d'explorer le rôle de E-CADHÉRINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes. Nous avons étudié l'effet d'une perte de l'expression du gène codant pour la E-CADHÉRINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes et la pigmentation résultant de cette perte. Comme la E-CADHÉRINE est la principale CADHÉRINE exprimée par les mélanocytes de l'épiderme, **notre hypothèse est que la E-CADHÉRINE serait impliquée dans l'expansion des mélanoblastes de l'épiderme des pattes et de la queue.**

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, les mélanoblastes dérivent des cellules de crêtes neurales (CCN) migrant dorso-latéralement (première vague) ou dorso-ventralement (seconde vague) dans l'embryon. Au cours du développement embryonnaire, la voie WNT / β-CATÉNINE est essentielle dans la détermination, la migration et la prolifération des mélanoblastes migrant dorso-latéralement dans l'embryon. Cependant, malgré le rôle majeur de β-CATÉNINE dans le développement des mélanoblastes issus de la première vague, son rôle dans la spécification des mélanoblastes de la seconde n'est pas connu. Nous avons étudié l'effet d'une stabilisation de la protéine β-CATÉNINE, donc d'une activation de la signalisation WNT / β-CATÉNINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes, notamment les mélanoblastes issus de la seconde vague. **Notre hypothèse est que β-**

CATÉNINE est impliquée dans la détermination de ces mélanoblastes issus de la seconde vague.

Ces études nous permettront de comprendre plus précisément le rôle des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE dans le développement embryonnaire et l'homéostase des mélanocytes de la peau. Les informations obtenues pourraient permettre de mettre en évidence un certain nombre de protéines clés ou de voies de signalisations pouvant être utilisées comme cibles thérapeutiques dans le traitement du Vitiligo ou d'autres pathologies impliquant les mélanocytes.

RÉSULTATS

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS :

Les résultats seront présentés selon deux parties distinctes. La première partie s'intéresse au rôle des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE dans les événements précoces de l'étiologie du Vitiligo. Ce projet a fait l'objet d'une publication scientifique dans le *Journal of Investigative Dermatology*.

- Article 1 : Altered E-cadherin level and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo. R. Y. Wagner*, F. Luciani*, M. Cario-André, A. Rubod, V. Petit, L. Benzekri, K. Ezzedine, S. Lepreux, E. Steingrimsson, A. Taieb, Y. Gauthier, L. Larue & V. Delmas.

Ensuite, des phénotypes de pigmentation du modèle murin ΔEcad non présentés dans l'article 1 seront décris. Cette partie aborde les effets d'une perte de E-CADHÉRINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes. Ces résultats préliminaires sont présentés sous la forme de résultats supplémentaires en français.

Enfin, la seconde partie concerne les effets d'une modulation de la stabilité de la protéine β-CATÉNINE dans le développement embryonnaire des mélanocytes. Ces résultats ne sont pas encore publiés mais sont présentés sous la forme d'un article scientifique en anglais.

- Article 2 : β-catenin differentially affects melanoblast development in the skin of the trunk and the paws. S. Colombo*, R.Y. Wagner*, D. Champeval, I. Yajima, V. Delmas and L. Larue. *En préparation.*

Partie 1 : L'ALTÉRATION DE LA E-CADHÉRINE DANS LES MÉLANOCYTES EST UN ÉVÈNEMENT PRÉCOCE DANS L'ÉTIOLOGIE DU VITILIGO

1.1. Contexte et objectifs

Le Vitiligo est une pathologie multifactorielle, polygénique induisant inévitablement la réduction, voire la perte totale des mélanocytes de l'épiderme. Plusieurs théories ont été décrites pour expliquer cette perte, mais aucune pathogenèse précise ne peut encore l'expliquer entièrement. Ces théories, développées seules ou combinées les unes aux autres, impliquent : une déficience auto-immune, une cytotoxicité neuronale ou encore une balance oxydative déficiente associée à une altération du taux de calcium. Enfin une théorie plus récente, « la mélanocytorrhagie » propose qu'un défaut d'adhésion des mélanocytes pourrait être à l'origine de leur disparition. Le détachement des mélanocytes de la lame basale et des kératinocytes adjacents, serait suivi d'une migration transepidermale qui aboutirait à la disparition des cellules pigmentaires (Gauthier et al., 2003a). Notre hypothèse a été que les cadhérines, notamment la E-CADHÉRINE qui module l'adhésion entre mélanocytes et kératinocytes, pourrait jouer un rôle dans cette pathologie. **L'objectif de ce projet de recherche a été d'observer les altérations éventuelles dans l'expression et la distribution de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes, avant la disparition de ces derniers, c'est à dire au niveau de la peau pigmentée des patients.**

1.2. Résultats

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Investigative Dermatology* dans l'édition de juillet 2015.

Article 1 : Altered E-cadherin level and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo. R. Y. Wagner*, F. Luciani*, M. Cario-André, A. Rubod, V. Petit, L. Benzekri, K. Ezzedine, S. Lepreux, E. Steingrimsson, A. Taieb, Y. Gauthier, L. Larue & V. Delmas.

Article 1 :

Altered E-cadherin level and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo

ORIGINAL ARTICLE

Altered E-Cadherin Levels and Distribution in Melanocytes Precede Clinical Manifestations of Vitiligo

Roselyne Y. Wagner[1,2,3,4,10], Flavie Luciani[1,2,3,4,10], Muriel Cario-André[5,6], Alain Rubod[1,2,3,4], Valérie Petit[1,2,3,4], Laila Benzekri[7], Khaled Ezzedine[5,6], Sébastien Lepreux[8], Eirikur Steingrimsson[9], A Taieb[5,6], Yvon Gauthier[5], Lionel Larue[1,2,3,4,11] and Véronique Delmas[1,2,3,4,11]

Vitiligo is the most common depigmenting disorder resulting from the loss of melanocytes from the basal epidermal layer. The pathogenesis of the disease is likely multifactorial and involves autoimmune causes, as well as oxidative and mechanical stress. It is important to identify early events in vitiligo to clarify pathogenesis, improve diagnosis, and inform therapy. Here, we show that E-cadherin (Ecad), which mediates the adhesion between melanocytes and keratinocytes in the epidermis, is absent from or discontinuously distributed across melanocyte membranes of vitiligo patients long before clinical lesions appear. This abnormality is associated with the detachment of the melanocytes from the basal to the suprabasal layers in the epidermis. Using human epidermal reconstructed skin and mouse models with normal or defective Ecad expression in melanocytes, we demonstrated that Ecad is required for melanocyte adhesiveness to the basal layer under oxidative and mechanical stress, establishing a link between silent/preclinical, cell-autonomous defects in vitiligo melanocytes and known environmental stressors accelerating disease expression. Our results implicate a primary predisposing skin defect affecting melanocyte adhesiveness that, under stress conditions, leads to disappearance of melanocytes and clinical vitiligo. Melanocyte adhesiveness is thus a potential target for therapy aiming at disease stabilization.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 5 March 2015; doi:10.1038/jid.2015.25

INTRODUCTION

Vitiligo is the most common chronic acquired depigmenting disorder, with a prevalence of ~1% in the world population (70 million people are affected) resulting from the loss of melanocytes from the basal epidermal layer (Taieb and Picardo, 2009; Ezzedine *et al.*, 2012). The progression of depigmentation in vitiligo is unpredictable, and there are no markers specific for the various steps of the disease. The etiology of vitiligo remains poorly understood, but progressive disease is clearly characterized by inflammatory infiltrates at the margin of lesions, suggesting an immune-mediated acceleration phase common to all forms of vitiligo (Picardo and Taieb, 2010). The inflammatory cells are mostly T cells usually found adjacent to the basal membrane where melanocytes are located. Several studies have detected serum antibodies directed against melanocyte antigens in vitiligo patients, and a correlation has been found between such antibodies and disease activity (Richmond *et al.*, 2013). Genetic investigations have implicated at least 30 susceptibility loci, encoding melanocyte components, including MC1R, TYR, and OCA2, immunoregulatory proteins targeting the innate and adaptive immunity, including HLA, PTPN22, and NLRP1, and cell adhesion molecules, including DDR1 (Silva de Castro *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013). Normally pigmented skin of vitiligo patients shows micro-depigmentation and vacuolization of melanocytes and/or keratinocytes (Tobin *et al.*, 2000). The underlying epidermal defect is poorly characterized. However, the imbalance between oxidant/antioxidant systems in the epidermis of vitiligo patients and high levels of oxidative stress markers in their peripheral blood are both consistent with the involvement of oxidative stress (Schallreuter *et al.*, 1999; Dammak *et al.*, 2009). After chemical and mechanical stresses, melanocytes may disappear from the basal layer of the epidermis (Schallreuter *et al.*, 2008). The site at which vitiligo macules begin is frequently determined by local conditions, such as continuous pressure or repeated friction

[1]*Institut Curie, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France;* [2]*CNRS UMR3347, Orsay, France;* [3]*INSERM U1021, Orsay, France;* [4]*Equipe labellisée, Ligue Nationale contre le Cancer, Orsay, France;* [5]*Department of Dermatology and Pediatric Dermatology, National Reference Centre for Rare Skin Disorders, Hôpital Saint-André Bordeaux, Bordeaux, France;* [6]*INSERM U1035, University of Bordeaux, Bordeaux, France;* [7]*Department of Dermatology, Mohammed V University, UFR of Dermatology, Rabat, Morocco;* [8]*Department of Pathology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France and* [9]*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Iceland, Reykjavik, Iceland*

[10]*The first two authors contributed equally to this work.*

[11]*Lionel Larue and Véronique Delmas are co-last authors.*

Correspondence: Lionel Larue, Institut Curie, Normal and Pathological Development of Melanocyte, Orsay, France. E-mail: lionel.larue@curie.fr

Abbreviations: DDR1, discoidin domain receptor tyrosine kinase 1; Ecad, E-cadherin; H_2O_2, hydrogen peroxide

Received 23 August 2014; revised 26 December 2014; accepted 14 January 2015; accepted article preview online 29 January 2015

© 2015 The Society for Investigative Dermatology

(Koebner's phenomenon) (Gauthier *et al.*, 2003; Taieb and Picardo, 2009). Koebner's phenomenon occurs in 21 to 62% of vitiligo patients, and some cutaneous sites are more prone (Diallo *et al.*, 2013). The molecular basis is unknown but may involve trauma-induced inflammation and cell adhesion defects (van Geel *et al.*, 2011). In keratinocytes in depigmented vitiligo lesions, the expression of two molecules implicated in cell–cell adhesion, DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1, also known as CD167a), and E-cadherin (Ecad), appeared to be weaker than normal (Kim and Lee, 2010; Ricard *et al.*, 2012). Cadherins are a family of Ca^{2+}-dependent transmembrane proteins mediating specific homophilic cell–cell adhesion. Ecad is the major adhesion molecule mediating melanocyte–keratinocyte interactions. Ecad is essential for both the establishment of epithelial structures during development and numerous dynamic processes such as differentiation, polarity, proliferation, and migration during morphogenesis and homeostasis (Larue *et al.*, 1994; Nishimura and Takeichi, 2009; Niessen *et al.*, 2011). Homophilic Ecad cell–cell adhesion is sensitive to environmental redox status and is highly dependent on Ca^{2+} levels (Chan *et al.*, 2010). Both redox status and Ca^{2+} level are deregulated in the epidermis of vitiligo patients (Schallreuter *et al.*, 2007), implicating eventually Ecad in vitiligo pathogenesis.

We report that numerous melanocytes in nonlesional areas of the skin in vitiligo patients present membranous Ecad deficiency correlated with mislocalization of melanocytes. We also show that epidermal melanocytes lacking/reducing Ecad are poorly resistant to both mechanical and chemical stresses. The molecular alteration to Ecad in melanocytes might constitute a predictive factor for resistance to stress conditions in vitiligo patients and may help to optimize patient management.

RESULTS

Altered distribution of Ecad at the membrane of melanocytes from vitiligo patients

We studied the distribution of Ecad in epidermal melanocytes in samples from 10 healthy controls and from nonlesional skin distant from the depigmentation macules, mainly the buttock area, in 29 vitiligo patients (Supplementary Table S1 online). Depigmented skin from vitiligo patients did not contain melanocytes (data not shown). Melanocytes were classified into three types according to the presence and discontinuity of the Ecad labeling: homogeneous (type 1), heterogeneous (type 2) labeling at the cell surface, and no labeling (type 3) (Figure 1a). The percentage of melanocytes showing each of the three types of staining pattern was recorded for each biopsy (Figure 1b and Supplementary Figure S1 online); ~2,000 melanocytes were analyzed, with a mean of 50 melanocytes per biopsy. All three types of labeling were observed in melanocytes in the epidermis of healthy controls and vitiligo patients. However, a larger proportion of melanocytes in vitiligo patients showed abnormal Ecad labeling at the membrane. In all, 43% of vitiligo melanocytes and 78% of control melanocytes had an homogeneous staining for Ecad and were classified as type 1. Confocal microscopy with immunofluorescence labeling of Ecad was used to confirm these findings and did not show any difference with routine inverted analysis (data not shown). Furthermore, the epidermis was reconstructed in standard medium conditions with melanocytes derived from controls and vitiligo patients; most (82%) vitiligo melanocytes but few (22%) control melanocytes lacked Ecad (Figure 1d and e). β-Catenin, the major cytoplasmic partner of Ecad at the plasma membrane, was similarly discontinuously distributed in, or absent from, melanocyte membranes in vitiligo patients (45 vs. 73% for controls) (Figure 1c and Supplementary Figure S2 online). The amount of nuclear β-catenin was similarly low in melanocytes from vitiligo patients and healthy controls. Thus, the distribution and/or abundance of the cell–cell adhesion molecule, Ecad, and β-catenin were abnormal in clinically normal skin of vitiligo patients. Ecad staining at the membrane of keratinocytes appeared similar in pigmented areas of vitiligo patients and in healthy controls (Figure 2a). It has been established that IL1β is expressed in all epidermal layers of lesional and perilesional vitiligo skin (Marie *et al.*, 2014). To assess whether altered Ecad in human melanocytes *in vivo* is associated with the activation of the pro-inflammatory cytokine IL1β, we performed IL1β staining (Supplementary Figure S3a and b online). IL1β expression was similar in nonlesional vitiligo and control skin, suggesting that there is no increased (or reduced) activity of the NLRP inflammasome in nonlesional vitiligo epidermis. However, we detected an infiltration of CD3-positive cells in nonlesional vitiligo epidermis that was not present in normal epidermis (Supplementary Figure S3d and c online).

Alteration of melanocyte distribution in the epidermis of nonlesional skin of vitiligo patients

During the analysis of Ecad in melanocytes in the skin of vitiligo patients, we observed that numerous melanocytes were not located at the basal layer but in the suprabasal layers of the epidermis (Figure 2a). We therefore evaluated melanocyte distribution in the epidermis. Although the total numbers of melanocytes in vitiligo and control epidermis were similar, ~25% of the melanocytes in vitiligo epidermis were located in the suprabasal layers compared with 5% in controls (Figure 2b). We used anti-cleaved caspase 3 antibody to evaluate the viability of suprabasal melanocytes from 8 vitiligo and 4 control skin biopsies; 46% of suprabasal vitiligo melanocytes but only 9% of the controls were apoptotic (Supplementary Figure S4 online). This indicates that vitiligo melanocytes, once they are detached from the basal membrane, are more prone to cell death. The numbers of suprabasal melanocytes in buttock and thigh skin from four healthy controls and eight vitiligo patients were plotted against the percentage of Ecad type 1 melanocytes (Figure 2c). There was an inverse correlation between the numbers of melanocytes in the upper layer of the epidermis and homogeneous staining of Ecad in melanocytes. These observations suggest that low Ecad abundance in melanocytes correlates with melanocyte detachment from the basal membrane of the epidermis. We analyzed melanocyte distribution in the basal layer of the epidermis in buttock and thigh skin from four healthy controls and four vitiligo patients (Figure 2d). The

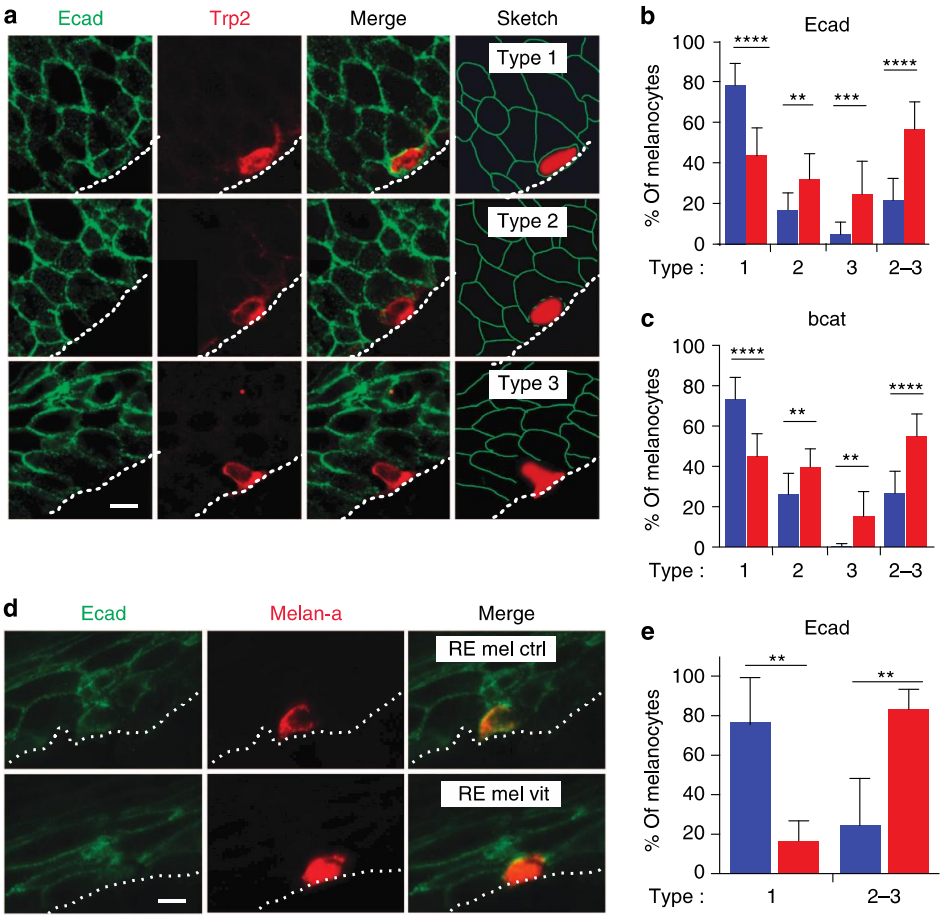


Figure 1. E-cadherin (Ecad) staining is altered in vitiligo melanocytes. (**a**) Staining of Ecad (green) and Trp2 (red, specific of melanocytes) of the epidermis. A simplified sketch shows the merge. Type 1: Ecad staining is homogeneously distributed in melanocyte; type 2: Ecad staining is heterogeneous; and type 3: Ecad staining is absent. Scale bars = 20 μm. The dotted lines represent the basal membrane. Bars = 20 μm. (**b**, **c**) Mean percentages of control (blue) and vitiligo patient (red) melanocytes displaying type 1, 2, and 3, and types 2 and 3 (2–3) labeled with Ecad and β-catenin (bcat)-specific antibodies. (**d**) Staining of Ecad (green) and Melan A (red) of reconstructed epidermis made with control keratinocytes and either control (RE mel crtl) or nonlesional vitiligo (RE mel vit) melanocytes. Bars = 20 μm. (**e**) Mean percentages of control (blue) and vitiligo (red) melanocytes displaying Ecad type 1 or type 2–3. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$.

number of keratinocytes between two basal melanocytes was larger (9.0 ± 0.4) in vitiligo epidermis than in control epidermis (6.0 ± 0.3). This indicates that despite the normal pigmentation in the nonlesional vitiligo biopsies, the ratio between the numbers of melanocytes and keratinocytes was abnormal. Therefore, the epidermal-melanin unit in vitiligo patients is modified, but insufficiently, to have a visible effect on skin pigmentation.

Loss of Ecad in melanocytes reduces proliferation and induces vacuole formation

To assess the function of Ecad in epidermal melanocytes, mice with Ecad-deficient melanocytes (ΔEcad mutants) were generated by mating Tyrosinase-Cre recombinase mice (Tyr::Cre) with Ecad mice harboring loxP sites flanking exons 6–10 ($Ecad^{F/F}$). The invalidation of Ecad in melanocytes has no major consequence on the coat color of the hairy part of the mice; P-cadherin is the major cadherin in follicular melanocytes (Figure 3a). In the tail and paws, most melanocytes are epidermal and Ecad is the main cadherin. In 83% of the mutant mice, the absence of Ecad was associated with lower than normal pigmentation of the tail, with a depigmented tip, and paws. This phenotype is because of the low numbers of epidermal melanocytes in the ΔEcad mutants due to proliferative defect of these cells during development (Figure 4). However, there was no mislocalization of ΔEcad melanocytes within the epidermis: the cells were found in the basal membrane at the epidermal–dermal junction (Figure 3b). Ultrastructural analysis revealed that many ΔEcad mutant melanocytes contained numerous large cytoplasmic vacuoles, not present in wild-type melanocytes (Figure 3c). These vacuolar ΔEcad melanocytes are reminiscent of the vitiligo melanocytes in pigmented skins (Figure 3d) confirming previous findings (Picardo and Taieb, 2010; Tobin *et al.*, 2000). However, despite these similarities between ΔEcad and vitiligo melanocytes, ΔEcad

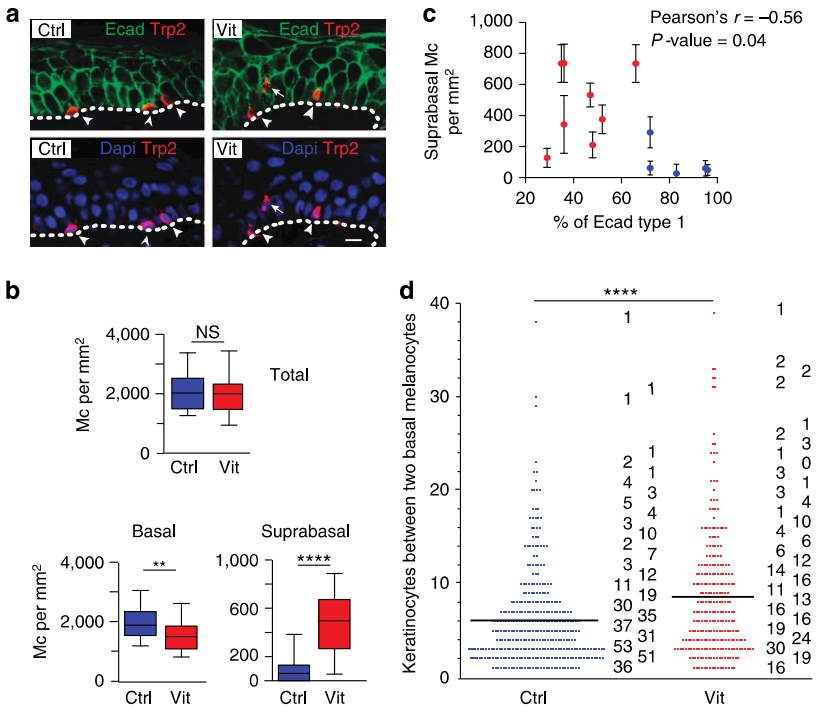


Figure 2. The amount of E-cadherin (Ecad) correlates with the numbers of melanocytes of the upper layer of the epidermis. (**a**) Human epidermis from controls (Ctrl) and vitiligo patients (Vit) labeled with anti-Ecad and Trp2 antibodies and DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole; blue). Basal melanocytes are indicated by white arrowheads and suprabasal melanocytes by white arrows. Bars = 20 μm. (**b**) Numbers of melanocytes (Mc) in control (blue) and nonlesional vitiligo skin sections (red). (**c**) Inverse correlation between the number of suprabasal melanocytes and Ecad; Pearson's correlation coefficient of −0.56. Red dots indicate vitiligo patients and blue dots indicate controls. (**d**) Number of keratinocytes between two melanocytes in the epidermis of controls and in nonlesional skin of vitiligo patients. Each individual score is represented as a dot (blue = control, red = vitiligo). On the right, the number of scores of each value is indicated. Means of the number of keratinocytes are represented by horizontal bars: 6 ± 0.3 for controls and 9 ± 0.4 for vitiligo. $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$; NS, nonsignificant.

mutant tails did not develop depigmented macules with age. This may be simply because the life span of mice is too short (a maximum of 2 years): 2/3 of cases of human vitiligo appear during adulthood when they reach 20–30 years of age.

Loss of Ecad in melanocytes alters melanocyte resistance to mechanical stress

The site at which vitiligo macules begin is frequently determined by local conditions, such as repeated friction, known as Koebner's phenomenon (Gauthier *et al.*, 2003; Taieb and Picardo, 2009). We therefore induced Koebner's phenomenon on mouse tails. Tails of wild-type and ΔEcad mice were subjected to repeated brushing for up to 30 weeks: the proximal part was brushed, and as control the distal part was not brushed (Figure 3e). Depigmentation was detected within 1 month of brushing and increased with time (Figure 3e and not shown). In ΔEcad mouse tails, the depigmentation correlated with a significant reduction in the numbers of melanocytes (Figure 3f). In brushed tail skin, melanocytes were observed in suprabasal layers; there were three to four times more suprabasal melanocytes in ΔEcad mice than in wild-type mice (Figure 3g and h). Therefore, Ecad appears to be required for the maintenance of melanocytes at the basal membrane and contributes to resistance to mechanical stress applied to the skin.

Oxidative stress affects membranous Ecad and induces transepidermal migration of melanocytes in reconstituted epidermis

We evaluated reactive oxygen species production (Rahman *et al.*, 2002) in nonlesional vitiligo and control biopsies using 4-hydroxynonenal (4-HNE) as a marker of lipid peroxidation. We found a strong 4-HNE signal in biopsies from six of seven cases of nonlesional vitiligo, and no signal in biopsies from any of the five controls (Figure 5a and b). In parallel, all these biopsies were stained for Ecad: the amount of Ecad was altered in all nonlesional vitiligo biopsies even in the sample in which lipid peroxidation was not abundant. To evaluate the oxidative stress on Ecad, the nonaggressive human melanoma cell line, MNT1, was exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2). This leads to the loss of cell–cell contacts as observed by phase contrast analysis (data not shown), resembling an epithelial–mesenchymal transition phenomenon (Morali *et al.*, 2001). No cell death was observed under these conditions (data not shown). The level of Ecad decreased substantially at the cell membrane (Figure 5c–h). Confocal microscopy confirmed these results (data not shown). We generated reconstructed

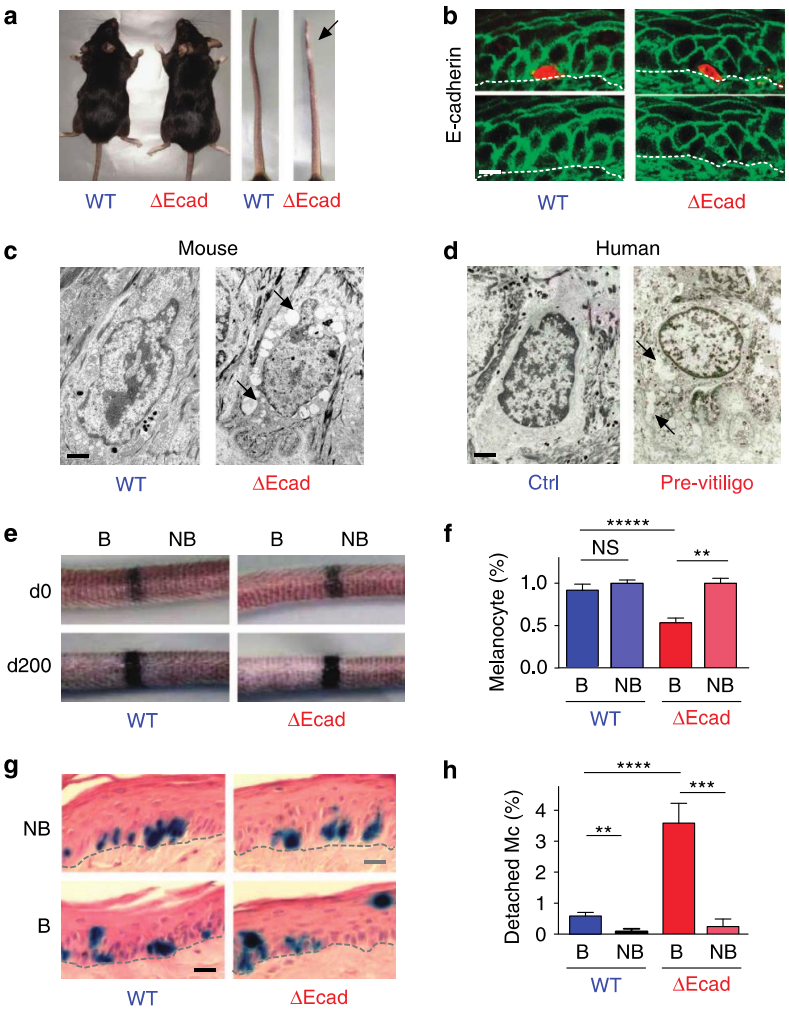


Figure 3. Loss of E-cadherin (Ecad) favors murine melanocyte detachment after skin friction. (**a**) Hair and tail pigmentation in wild-type (WT) mice and mice lacking Ecad in melanocytes (ΔEcad). Dramatic depigmentation zone (arrow). (**b**) Immunostaining of tail skin of controls and ΔEcad mice in a Dct::LacZ genetic background using anti-Ecad (green) and β-galactosidase (βgal; red) antibodies. Scale bar = 10 μm. Basement membrane is indicated as a dotted line. Bars = 20 μm. (**c**, **d**) Transmission electron micrographs of WT and ΔEcad epidermal mouse melanocytes. Bars = 2 μm (**c**) and human control and vitiligo epidermal melanocytes from nonlesional skin (**d**). Note the large vacuoles, black arrows, in the cytoplasm of murine ΔEcad and human pre-vitiligo melanocytes. (**e**) Photographs of WT and ΔEcad tails before (d0) and after repeated friction (d200). Tails were brushed 5 days a week for 28 weeks. Boundary between the brushed (B) and nonbrushed (NB) parts of the tail is indicated. (**f**) Numbers of melanocytes found in NB and B parts for each genotype. Tail sections 866, 980, 624, and 550 corresponding to WT-B, WT-NB, ΔEcad-B, and ΔEcad-NB, respectively, were generated from three WT and three ΔEcad mice. Histograms represent the ratio between the number of melanocytes found in NB and B parts and that in the NB part for each genotype, as percentages. (**g**) Location of melanocytes within the epidermis of the B and NB epidermis. Note that some melanocytes were found in the suprabasal epidermis after friction. Bars = 20 μm. (**h**) Percentage of detached melanocytes (Mc). The number of sections per mouse tail and the number of mice are given in **f**. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$; NS, nonsignificant.

epidermis with keratinocytes from healthy controls and human melanocytes transduced with a control vector (Ctrl) or with a vector silencing Ecad expression (shEcad). After 2 weeks in culture, the reconstructed epidermis samples were treated with 0.025% H_20_2 for 6 hours before analysis. Western blotting confirmed that there was less Ecad in shEcad cells than the controls (data not shown). The number of melanocytes at the basal layer in reconstructed epidermis after 2 weeks in culture was similar for shEcad-treated and -untreated samples (Figure 5i), and the number of detached melanocytes was similar (Figure 5j). We then evaluated the consequence of a reduction of Ecad combined with oxidative stress on the detachment of melanocytes (Figure 5i-k). The numbers of detached melanocytes was significantly higher in the presence of H_20_2 and a low concentration of Ecad (Figure 5i–k). This result is in agreement with the previously described detachment of vitiligo melanocytes upon H_20_2 treatment (Cario-Andre *et al.*, 2007). In conclusion, the reduction of Ecad in melanocytes and oxidative stress both act on the detachment of melanocytes from the basal membrane.

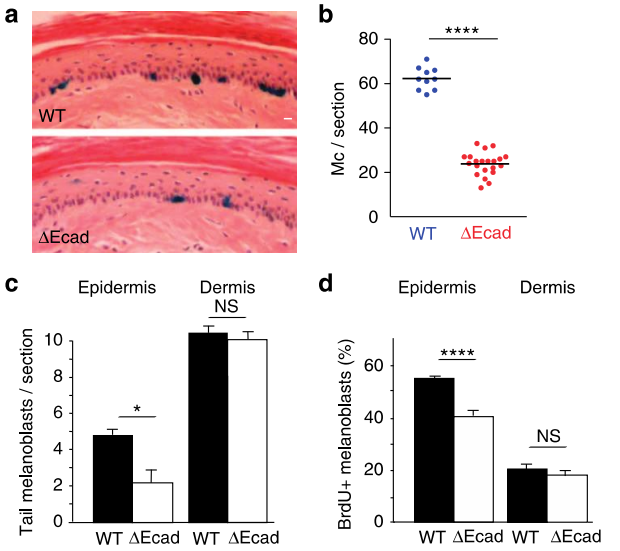


Figure 4. Loss of E-cadherin (Ecad) affects melanoblast proliferation during embryogenesis specifically in the epidermis. (**a**) Transverse sections of wild-type (WT) and ΔEcad tails of p10 (postnatal day 10) mice in a Dct::LacZ genetic background. Melanocytes are identified as β-galactosidase-positive cells. Bars = 50 μm. (**b**) Scatter dot plot reporting the number of melanocytes (Mc) in sections of WT and ΔEcad tails at p10. Each dot represents the average of four sections from the same mouse. Five mice of each group were studied. (**c**) Number of melanoblasts in the epidermis and the dermis of WT and ΔEcad mouse tails at E15.5. The number of melanoblasts in the epidermis and dermis found in mouse tails at E15.5 was determined for four WT and three ΔEcad embryos. The numbers of melanoblasts in the epidermis, but not in the dermis, were smaller in ΔEcad compared with WT embryos. (**d**) Proliferation rate of Dct::lacZ-positive cells at E15.5 in the tail, as evaluated by measuring BrdU incorporation as previously described (Luciani *et al.*, 2011). Approximately 70 sections, derived from two to four embryos from independent litters, were analyzed for each genotype. No apoptotic melanoblasts were detected at E15.5 in either mutants or controls (data not shown). *$P<0.05$, ****$P<0.0001$; NS, nonsignificant.

DISCUSSION

Vitiligo is a complex skin disorder involving a chain of events leading ultimately to the loss of melanocytes. We report a thorough analysis of clinically normal pigmented skin of vitiligo patients showing that Ecad, which has a key role for the adhesion between melanocytes and keratinocytes, is abnormally distributed in the membrane. The low Ecad levels in melanocytes are associated with a suprabasal location of melanocytes and a decreased ratio of melanocytes to keratinocytes in the basal layer of the epidermis. In stressed murine melanocytes lacking Ecad and in vitiligo epidermis the detached melanocytes are not adequately replaced in the basal layer, possibly because of an exhaustion of melanocyte renewal, as proposed (Taieb, 2000). We suggest that altered Ecad distribution in melanocytes precedes vitiligo pathogenesis but remains silent until melanocyte renewal becomes a limiting factor for normal pigmentation of the skin (Supplementary Figure S5 online). We also demonstrated that Ecad is required for melanocyte resistance to mechanical and oxidative stress, establishing a link between silent, cell-autonomous defects in vitiligo melanocytes and known environmental stressors accelerating disease expression.

The loss of Ecad from the surface of melanocytes could be due to: (1) a cell lineage–specific underexpression of Ecad in melanocytes of vitiligo patients, (2) a selective downregulation of Ecad at the interface between melanocytes and keratinocytes, or (3) a general reduction of Ecad abundance in all Ecad-expressing cells (including all epithelial cells and, of course, keratinocytes) in vitiligo patients. Consequences of this loss are apparent only in melanocytes because the physiological abundance of Ecad at the cell–cell contact is much lower than in keratinocytes. Correct cadherin function requires appropriate amounts of cadherin–catenin at cell–cell contacts, maintained by a complex balance between synthesis, recycling, and degradation. Ecad can be downregulated by the expression of negative transcriptional regulators (well known in the context of epithelial–mesenchymal transition) and by epigenetic and/or allogenetic regulations (Larue and Bellacosa, 2005; De Craene and Berx, 2013). However, none of these events have been identified in vitiligo pathophysiology. Similarly, no polymorphisms have been found in the *Cdh1* locus or its regulators despite recent genome-wide association studies with a large cohort of patients (Jin *et al.*, 2012). We confirmed this result with a larger cohort from Iceland (not shown). In the context of vitiligo, the proteins aquaporin (AQP3) and CCN3-DDR1 have been identified as regulating the amount of Ecad at the cell membrane (Kim and Lee, 2010; Yeh *et al.*, 2011; Ricard *et al.*, 2012). Consistent with the presence of Ecad at the membrane requiring AQP3 and DDR1, the epidermis in lesional skin contains abnormally low levels of all of Ecad, AQP3, and DDR1 (Kim and Lee, 2010; Ricard *et al.*, 2012; Reichert-Faria *et al.*, 2013; Benzekri *et al.*, 2014). DDR1 has a key role in the adhesion of melanocytes to the basal membrane, and it would be informative to evaluate DDR1 expression in nonlesional vitiligo epidermis particularly in melanocytes (Ricard *et al.*, 2012). In addition, ICAM-1 may be relevant to vitiligo progression (Norris, 1990). Moreover, soluble factors such as endothelin-1 and tumor necrosis factor-α repress Ecad (Jamal, 2000; Bigatto *et al.*, 2014), and the levels of endothelin-1 and tumor necrosis factor-α have been shown to be higher in vitiligo patients than in controls (Imokawa, 2004; Lee, 2012). Possibly, several intrinsic factors, each slightly abnormal in vitiligo patients, and/or with extrinsic factors act in combination or even synergistically affect Ecad expression.

There is mounting evidence implicating oxidative stress in vitiligo pathogenesis (Glassman, 2011; Denat *et al.*, 2014). Melanocytes are much more sensitive to oxidative stress than keratinocytes that contain larger amounts of antioxidants and can transfer H_2O_2 to melanocytes (Pelle *et al.*, 2005). High H_2O_2 concentration destabilizes Ecad and β-catenin complexes at the membrane disrupting cell–cell adhesion. Both these notions are consistent with our observation of low Ecad levels in melanocytes but not keratinocytes in clinically normal skin in vitiligo patients. This possibility is also coherent with the gradual loss of Ecad initially only from melanocytes of normally pigmented skin and subsequently from melanocytes and keratinocytes in perilesional and depigmented skin

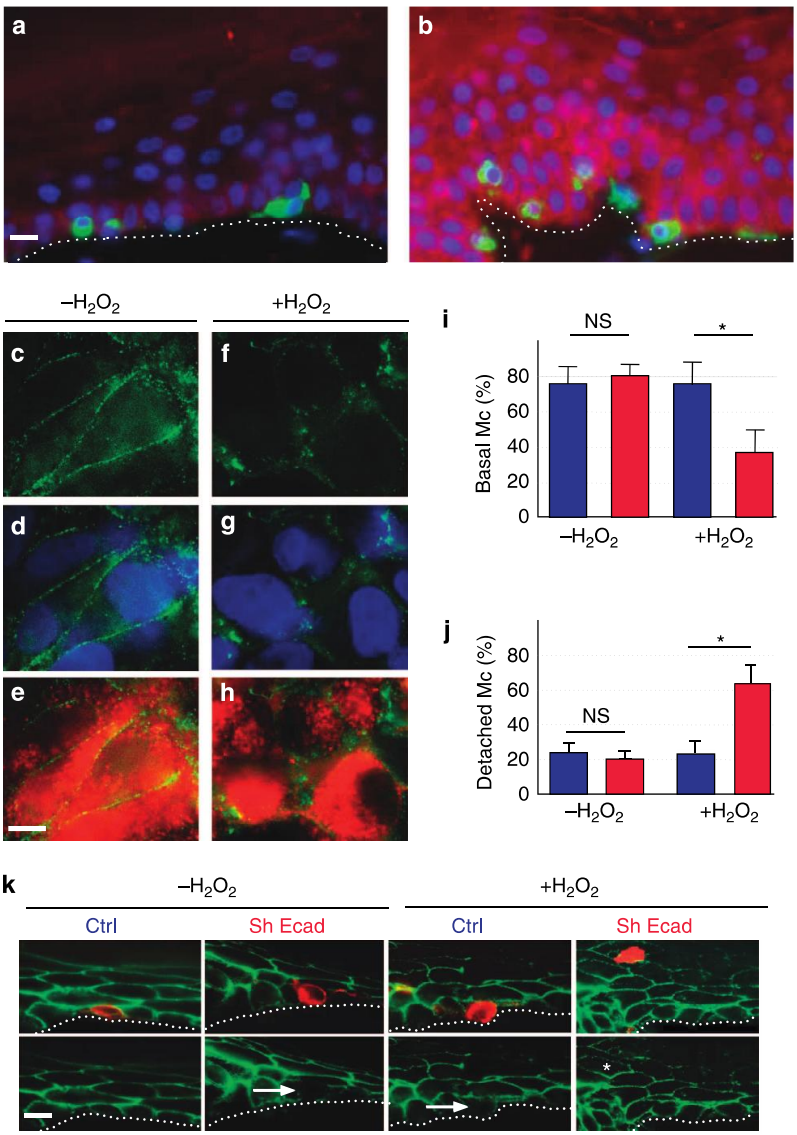


Figure 5. Loss of E-cadherin (Ecad) from the melanocyte membrane and melanocyte detachment in reconstructed human epidermis after exposure to hydrogen peroxide (H_2O_2). (**a**, **b**) Immunostaining of control (**a**) and vitiligo (**b**) biopsies using anti-4-HNE (red) and Trp2 (green) antibodies. DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole; blue). Bars = 20 μm. (**c–h**) Human MNT-1 melanoma cells incubated with (**f–h**) or without (**c–e**) 0.025% H_2O_2 for 6 hours and labeled with anti-Ecad (green), Melan A (red) antibodies, and DAPI (blue). (**c–h**) Ecad, (**d**, **g**) Ecad + DAPI, (**e**, **h**) Ecad + Melan A. Bars = 10 μm. (**i**, **j**) Percentages of basal (**i**) and detached (**j**) melanocytes (Mc) in reconstructed epidermis with normal Sh Ecad (ShEcad, red) or Puro (Ctrl, blue) transduced melanocytes. Reconstructed epidermis was treated or not with 0.025% H_2O_2 for 6 hours. (**k**) Reconstructed epidermis with ShEcad transduced or Ctrl melanocytes incubated with or without 0.025% H_2O_2 for 6 hours and labeled with anti-Ecad (green) and melan A antibodies (red). Ecad labeling is weak at the melanocyte membrane in ShEcad samples without H_2O_2 (arrows) and in Ctrl melanocytes after H_2O_2 treatment. Ecad labeling was totally absent from ShEcad melanocyte-exposed H_2O_2 (star). The dotted line indicates the epidermis–dermis junction. Bars = 20 μm. *$P<0.05$; NS, nonsignificant.

of vitiligo patients (this paper and (Kim and Lee, 2010; Benzekri *et al.*, 2014)). These observations are consistent with the decline of Ecad abundance in melanocytes as an early event in vitiligo pathogenesis. Altogether, one may believe that oxidative stress occurs in melanocytes in which Ecad is already abnormal and that the two phenomena cooperate to the loss of Ecad from the cell membrane and melanocyte detachment from the basal membrane.

A major source of skin stress is frequent exposure to pressure and friction. The mechanisms converting mechanical forces into a biological signal in the skin have not been characterized, but our findings clearly demonstrate that, under such stress conditions, melanocyte attachment to the basal layer is dependent on Ecad expression. Here, we identify a comprehensive molecular mechanism for the melanocytorrhagy theory, based on melanocyte detachment following

standardized friction of the skin of vitiligo patients (Gauthier *et al.*, 2003). Detached melanocytes in the suprabasal layer might translate various stresses into an immune reaction, e.g., via the heat shock protein HSP70, consistent with the larger numbers of Langherans cells in the vicinity of melanocytes and previous findings (Tobin *et al.*, 2000; van Geel *et al.*, 2012). In normal pigmented skin of vitiligo patients, the loss of Ecad may generate a damage-associated molecular pattern, providing, in turn, the initiating danger signal that activates innate immunity. It seems unlikely that the innate immunity is activated through the inflammasome production of IL1β because IL1β expression was similar in the epidermis of vitiligo patients and controls (Supplementary Figure S3a and b online); the findings from analysis of the mouse model presented were also consistent with this conclusion (data not shown). However, adaptive immunity, assessed according to the presence of CD3-positive cells infiltrating the dermis, was induced in vitiligo patients but not controls (Supplementary Figure S3c and d online). Nevertheless, the link between altered Ecad expression and the immune component of vitiligo remains to be established.

In conclusion, we identified a functional alteration of cell–cell adhesion mediated by Ecad in vitiligo epidermis. Preliminary experiments reveal similar loss of Ecad from segmental vitiligo melanocytes. This suggests that impaired melanocyte adhesiveness is a common first step to melanocyte loss in all types of vitiligo. As found for filaggrin in another major chronic inflammatory skin disease, atopic dermatitis, a link from a structural defect in the epidermis to an inflammatory sequence can now be plausibly suggested. Indeed, early-onset vitiligo is associated with atopic diathesis (Ezzedine *et al.*, 2011), possibly increasing local immune-inflammatory responses because of the associated epidermal barrier defect (Irvine *et al.*, 2011). Our findings suggest that the magnitude of the Ecad defect in vitiligo may be predictive of resistance to stress conditions and may help patient management if correlated to disease severity. In addition to treatments aiming to stabilizing vitiligo including immune-mediated skin inflammation, an approach to treating this disease also involves strategies to improve melanocyte adhesiveness to the basal membrane.

MATERIALS AND METHODS

Skin biopsies

Patients provided signed informed consent before the study that was approved by the relevant local ethics committees (Bordeaux CNIL #1545937 v.0 and Rabat Hospitals). The mean age of vitiligo patients and controls was 46 and 43 years, respectively (range 20–67-years for both). The mean duration of the disease for the vitiligo group was 7 years (range 1–20 years). There were no significant differences between controls and patients for age or sex, although the proportion of males was slightly higher in the control group. Punch skin biopsies (4 mm) were obtained from adult patients with generalized vitiligo from clinically normal skin distant from depigmented lesions and from normal adults undergoing plastic surgery (see Supplementary Table S1 online). Skin biopsies were fixed in 4% paraformaldehyde, incubated in 30% sucrose, then in 30% sucrose with 50% optimal cutting temperature compound (OCT), and finally in 100% OCT.

Cell culture and epidermal reconstruction

Exponentially growing melanoma cells were seeded at a density of 10^6 cells per well in 12-well plates as described previously (Gallagher *et al.*, 2013). After 20 hours, the medium was replaced with a fresh medium with or without 0.025% H_20_2 (Sigma, Saint Quentin, France) and samples incubated for 6 hours. For epidermal reconstruction, human control or vitiligo melanocytes and control keratinocytes were cultured from skin samples obtained from adults undergoing plastic surgery or from children's foreskin obtained at circumcision as described earlier (Cario-Andre *et al.*, 2007). ShEcad (5′-AAGATA GGAGTTCTCTGATGCCTCGAGGCATCAGAGAACTCCTATCTT-3′) was expressed from the lentiviral puromycin vector (pLKO.1–18 bp stuffer and pLKO puro shEcad). Transduced melanocytes were selected by incubation with 7.5 μg ml^{-1} puromycin for 1 week, and epidermal reconstructions were performed as described previously (Ricard *et al.*, 2012). A total of 38 epidermal reconstructions were carried out including 11 treated with 0.025% H_20_2 for 6 hours.

Microscopy and morphological studies

For immunofluorescence, cells or sections from patient biopsies or epidermal reconstruction were incubated overnight at 4 °C with primary antibody diluted in phosphate-buffered saline/-1% BSA (w/v). Antibodies were specific for Ecad (610182, BD Bioscience, San Jose, CA and M108, Takara, Fisher Scientific Biosciences, St Leon-Rot, Germany), β-catenin (610154, BD Bioscience), Melan A (Dako M7196, Dako, Trappes, France), Trp2 (sc-10452, Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 4-HNE (HNE11-S, Alpha Diagnostics, Interchim, Montluçon, France), CD3 (Abcam ab699, Paris, France), IL1β (Abcam ab2105), and cleaved-caspase 3 (ASP175, Cell Signaling 9661, Danvers, MA); secondary antibodies were Alexa fluor A31570, A21206, A21208, A21202, A21432, and A21206 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fluorescence photomicrographs were obtained with a Leica-DM-IRB (Nanterre, France) inverted microscope or a TCS-SP5 confocal laser scanning microscope. Slides were read by two/three investigators who were blinded to the results, and the results diverged by between 0.5 and 5%. For transmission electron microscopy, the skin was fixed in 1.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline, processed for transmission electron microscopy by standard methods, and observed under a Tecnai-12-biotwin transmission electron microscope TEM (Philips Optique Electronique SAS, Limeil Brévannes, France).

Mouse studies

Mice with a conditional deletion of the Ecad gene (*Cdh1*) were generated by mating Tyr::Cre transgenic mice with animals homozygous for a floxed allele of Ecad (ΔEcad) (Boussadia *et al.*, 2002; Delmas *et al.*, 2003). Wild-type and ΔEcad mice were crossed with Dct::LacZ mice to visualize melanocytes in skin sections by Xgal coloration as previously described (Luciani *et al.*, 2011). Melanoblast proliferation was analyzed by BrdU labeling *in vivo* as described previously (Berlin *et al.*, 2012). All mice were backcrossed more than 10 times to C57BL/6 and housed in specific pathogen-free conditions at Institut Curie, conforming to French and European Union legislation. Skin friction was applied with a soft-bristled toothbrush for 2 min per day, 5 days a week for up to 30 weeks.

Melanocyte counts

Slides were scanned with an Olympus IX51 and analyzed with Olyvia software (Olympus, Rungis, France). Melanocytes in basal or suprabasal (spinous, granular layers, and stratum corneum) layers were counted in five independent skin sections and normalized per mm^2. The number of keratinocytes between two melanocytes was determined in five skin sections for each patient. A minimum of 2,220 basal keratinocytes were analyzed for each group. For mouse skin, between 139 and 205 counts were performed for each genotype and condition.

Statistical analysis

Graphpad Prism 6 software (La Jolla, CA) was used for statistical analyses. Ordinary one-way analysis of variance and unpaired *t*-tests were used to assess the significance of differences (****$P<0.0001$, ***$P<0.001$, **$P<0.01$, and *$P<0.05$; NS, nonsignificant).

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the animal colony (Y Bourgeois, JD Mam, and H Harmange) and imaging facilities (F Cordelières) of the Institut Curie. We are grateful to Alfonso Bellacosa (FCCC, Philadelphia) for critically reading the manuscript. RYW is recipient of a fellowship from the MENRT. RYW was a recipient of MENRT and ARC. FL was recipient of fellowships from the MENRT, ARC, Ligue contre le cancer (Oise), and Société Française de Dermatologie (SFD). This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée EL2012.LNCC/LL), INCa (2011-1-PL BIO-03-IC-1), and Labex CelTisPhyBio (ANR-11-LBX-0038).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/jid

REFERENCES

Benzekri L, Hmamouchi I, Gauthier Y (2014) Possible patterns of epidermal melanocyte disappearance in nonsegmental vitiligo: a clinicopathological study. *Br J Dermatol* 172:331–6

Berlin I, Luciani F, Gallagher SJ *et al.* (2012) General strategy to analyse coat colour phenotypes in mice. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:117–9

Bigatto V, De Bacco F, Casanova E *et al.* (2014) TNF-alpha promotes invasive growth through the MET signaling pathway. *Mol Oncol* 9:377–88

Boussadia O, Kutsch S, Hierholzer A *et al.* (2002) E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev* 115:53–62

Cario-Andre M, Pain C, Gauthier Y *et al.* (2007) The melanocytorrhagic hypothesis of vitiligo tested on pigmented, stressed, reconstructed epidermis. *Pigment Cell Res* 20:385–93

Chan HL, Chou HC, Duran M *et al.* (2010) Major role of epidermal growth factor receptor and Src kinases in promoting oxidative stress-dependent loss of adhesion and apoptosis in epithelial cells. *J Biol Chem* 285:4307–18

Dammak I, Boudaya S, Ben Abdallah F *et al.* (2009) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patients with stable and active vitiligo. *Int J Dermatol* 48:476–80

De Craene B, Berx G (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13:97–110

Delmas V, Martinozzi S, Bourgeois Y *et al.* (2003) Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* 36:73–80

Denat L, Kadekaro AL, Marrot L *et al.* (2014) Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. *J Invest Dermatol* 134:1512–8

Diallo A, Boniface K, Jouary T *et al.* (2013) Development and validation of the K-VSCOR for scoring Koebner's phenomenon in vitiligo/non-segmental vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:402–7

Ezzedine K, Diallo A, Leaute-Labreze C *et al.* (2011) Multivariate analysis of factors associated with early-onset segmental and nonsegmental vitiligo: a prospective observational study of 213 patients. *Br J Dermatol* 165: 44–9

Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T *et al.* (2012) Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:E1–13

Gallagher SJ, Rambow F, Kumasaka M *et al.* (2013) Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene* 32:2230–8

Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S *et al.* (2003) Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *Br J Dermatol* 148:95–101

Glassman SJ (2011) Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. *Clin Sci (Lond)* 120:99–120

Imokawa G (2004) Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 17:96–110

Irvine AD, McLean WH, Leung DY (2011) Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 365:1315–27

Jamal S (2000) Endothelin-1 down-regulates E-cadherin in melanocytic cells by apoptosis-independent activation of caspase-8. *J Am Acad Dermatol* 43:703–4

Jin Y, Birlea SA, Fain PR *et al.* (2012) Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat Genet* 44:676–80

Jin Y, Birlea SA, Fain PR *et al.* (2011) Genome-wide analysis identifies a quantitative trait locus in the MHC class II region associated with generalized vitiligo age of onset. *J Invest Dermatol* 131:1308–12

Kim NH, Lee AY (2010) Reduced aquaporin3 expression and survival of keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo. *J Invest Dermatol* 130:2231–9

Larue L, Bellacosa A (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24:7443–54

Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J *et al.* (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8263–7

Lee AY (2012) Role of keratinocytes in the development of vitiligo. *Ann Dermatol* 24:115–25

Luciani F, Champeval D, Herbette A *et al.* (2011) Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 138: 3943–54

Marie J, Kovacs D, Pain C *et al.* (2014) Inflammasome activation and vitiligo/nonsegmental vitiligo progression. *Br J Dermatol* 170:816–23

Morali OG, Delmas V, Moore R *et al.* (2001) IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20:4942–50

Niessen CM, Leckband D, Yap AS (2011) Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev* 91:691–731

Nishimura T, Takeichi M (2009) Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 89:33–54

Norris DA (1990) Cytokine modulation of adhesion molecules in the regulation of immunologic cytotoxicity of epidermal targets. *J Invest Dermatol* 95:111S–20S

Pelle E, Mammone T, Maes D *et al.* (2005) Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transferring hydrogen peroxide to melanocytes. *J Invest Dermatol* 124:793–7

Picardo M, Taieb A (2010) *Vitiligo.* Springer-Verlag: Heildelberg, 1–504

Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ *et al.* (2002) 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 166:490–5

Reichert-Faria A, Jung JE, Moreschi Neto V *et al.* (2013) Reduced immunohistochemical expression of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) in vitiligo skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27:1057–9

Ricard AS, Pain C, Daubos A *et al.* (2012) Study of CCN3 (NOV) and DDR1 in normal melanocytes and vitiligo skin. *Exp Dermatol* 21:411–6

Richmond JM, Frisoli ML, Harris JE (2013) Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. *Curr Opin Immunol* 25:676–82

Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M *et al.* (2008) Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol* 17:139–40

Schallreuter KU, Gibbons NC, Zothner C *et al.* (2007) Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress disrupts calcium binding on calmodulin: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun* 360:70–5

Schallreuter KU, Moore J, Wood JM *et al.* (1999) In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4:91–6

Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Walker G *et al.* (2010) Genetic variants of the DDR1 gene are associated with vitiligo in two independent Brazilian population samples. *J Invest Dermatol* 130:1813–8

Taieb A (2000) Intrinsic and extrinsic pathomechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res* 13(Suppl 8):41–7

Taieb A, Picardo M (2009) Clinical practice. Vitiligo. *N Engl J Med* 360: 160–9

Tang XF, Zhang Z, Hu DY *et al.* (2013) Association analyses identify three susceptibility Loci for vitiligo in the Chinese Han population. *J Invest Dermatol* 133:403–10

Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR *et al.* (2000) Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. *J Pathol* 191:407–16

van Geel N, Speeckaert R, Mollet I *et al.* (2012) In vivo vitiligo induction and therapy model: double-blind, randomized clinical trial. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:57–65

van Geel N, Speeckaert R, Taieb A *et al.* (2011) Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 564–73

Yeh YC, Wu CC, Wang YK *et al.* (2011) DDR1 triggers epithelial cell differentiation by promoting cell adhesion through stabilization of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 22:940–53

Altered E-cadherin levels and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo

R Wagner[1-4]#, F Luciani[1-4]#, M Cario-André[5,6], A Rubod[1-4], V Petit[1-4], L Benzekri[7], K Ezzedine[5,6], S Lepreux[5], E. Steingrimsson[8], A Taieb[5,6], Y Gauthier[5], L Larue[1-4]* & V Delmas[1-4]

Supplemental information

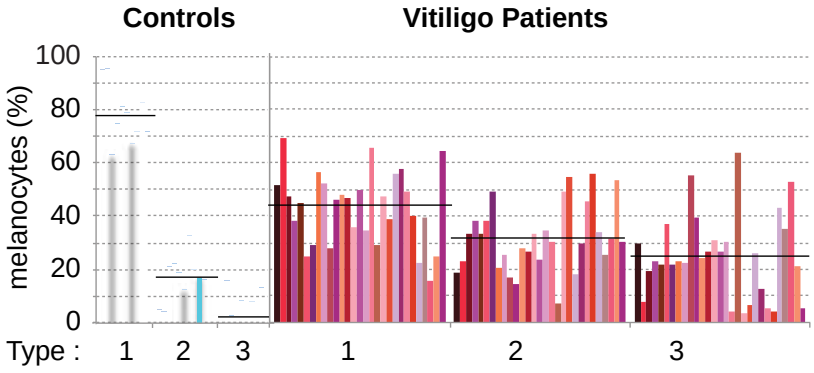


Figure S1 Wagner et al

Figure S1 : ***E-cadherin staining in control skin and in non lesional skin from vitiligo patients.*** Percentage of melanocytes displaying the three types of E-cadherin staining in each individual: 10 controls (blue histograms) and 29 vitiligo patients (red histograms). Horizontal bars indicate the means for each E-cadherin labeling type.

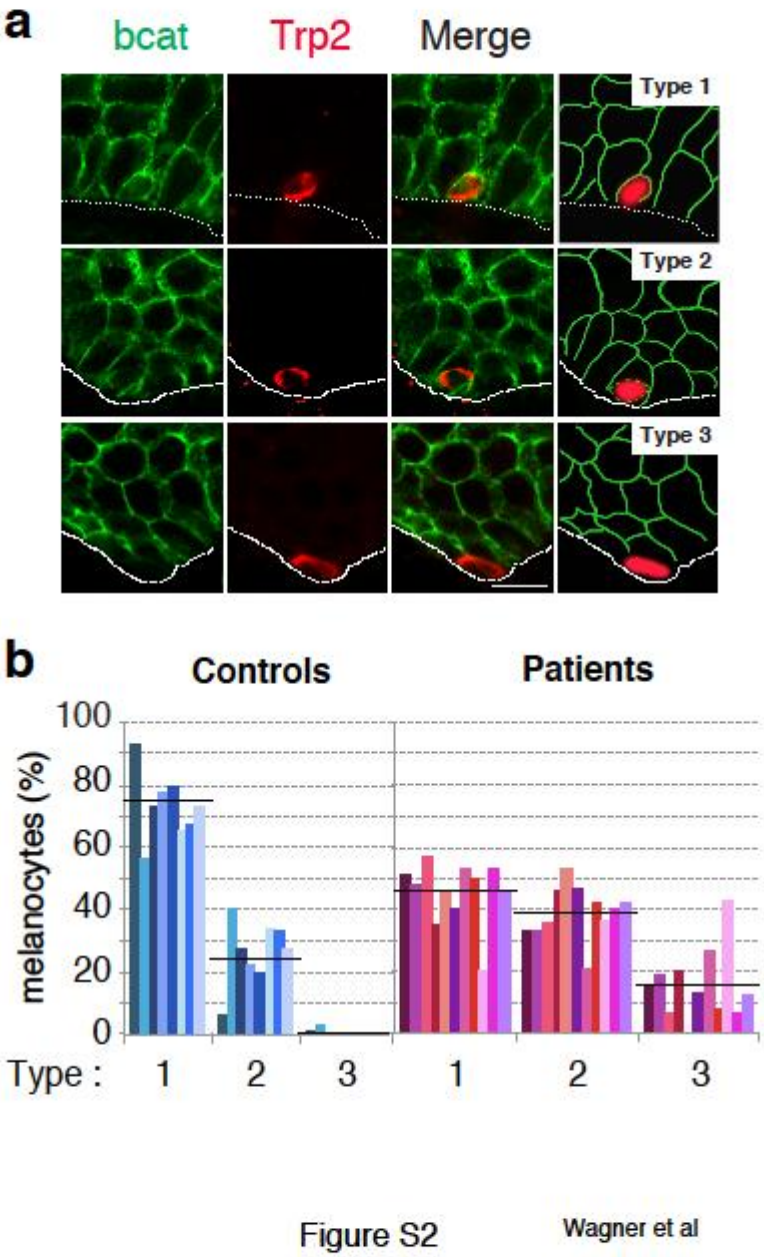


Figure S2 ***β-catenin staining in control skin and in non lesional skin from vitiligo patients*****.** a) Immunofluorescence staining of β-catenin (β-caténine, green) and Trp-2 (red) in human epidermis. B) Percentage of melanocytes in each patient displaying the three types of staining pattern: 8 controls (blue histograms) and 11 vitiligo patients (red histograms). Horizontal bars indicate the means for each β-catenin labeling type.

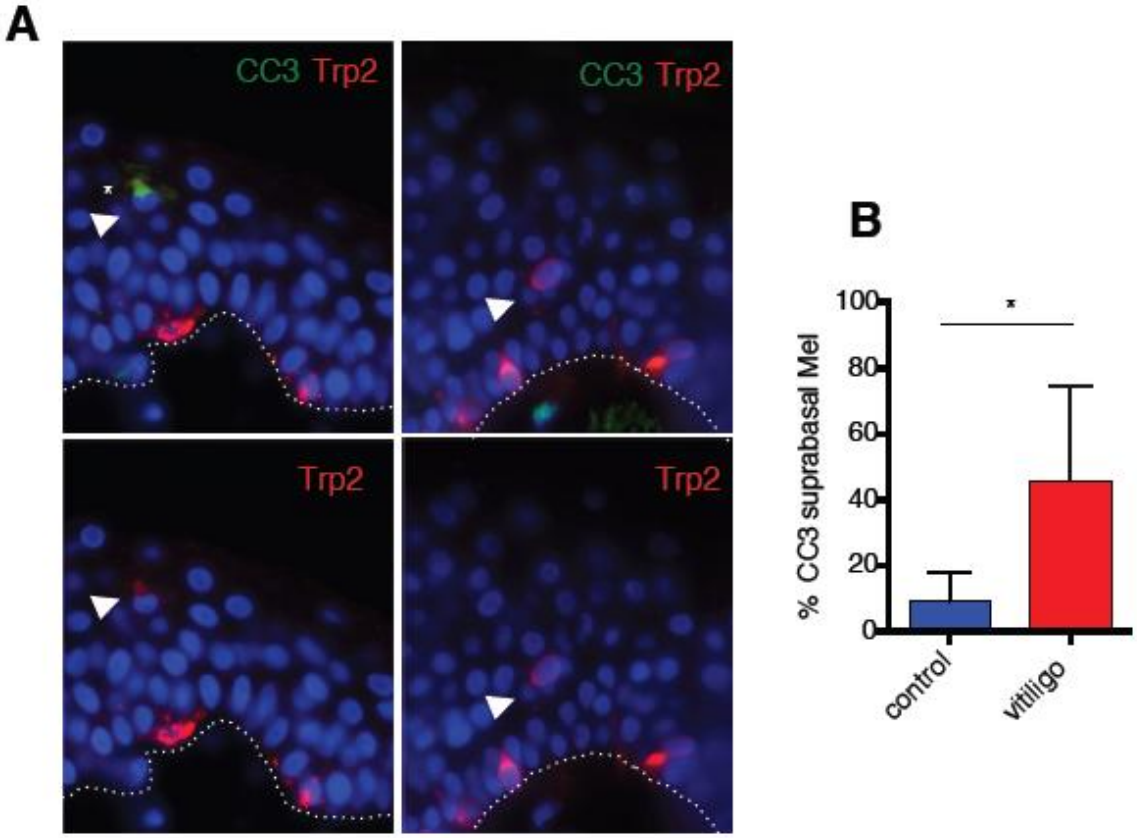


Figure S3 Wagner et al

Figure S3: Detection of apoptotic suprabasal melanocytes in control and non lesional skin from vitiligo patients. Immunostaining of control (a,b) and vitiligo (c,d) biopsies, using anti-trp2 (melanocyte in red, a-d) and anti-cleaved caspase 3 (CC3) antibodies (apoptotic cells in green a,c). Images are merged to reveal apoptotic melanocytes. e) Quantification of suprabasal melanocytes in control (crtl) and vitiligo (vit) epidermis according to their apoptotic status. Arrows indicate suprabasal melanocytes, and stars CC3 staining.

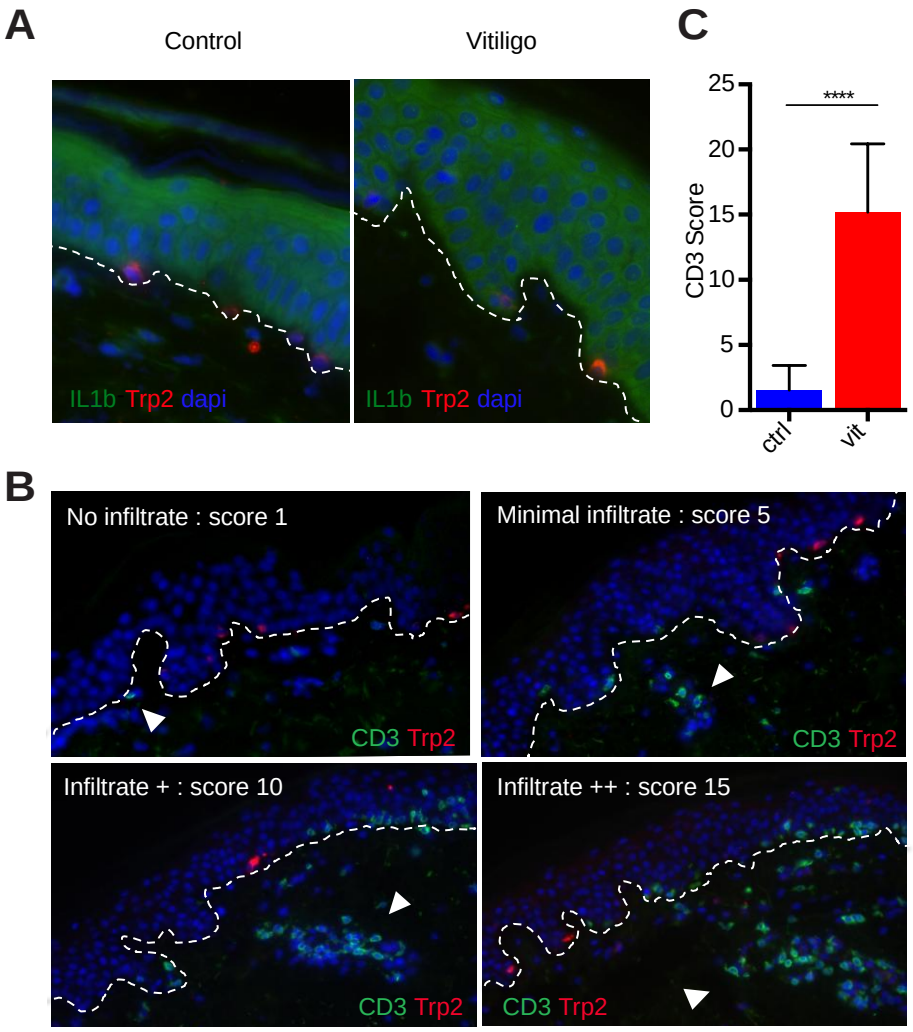


Figure S4 Wagner et al

Figure S4: Interleukin (IL)-1β distribution and detection of CD3-lymphocytic infiltrates in control skin and in non lesional skin from vitiligo patients. Immunostaining of control (a,c) and vitiligo (b,d) biopsies, using anti-trp2 (melanocyte in red), anti-IL-1β (epidermis in green)(a,b) and CD3 (lymphocyte in green) (c,d) antibodies, and DAPI (blue). Five to 40 CD3-positive cells are observed per field in vitiligo skin compared to either none or one in controls.

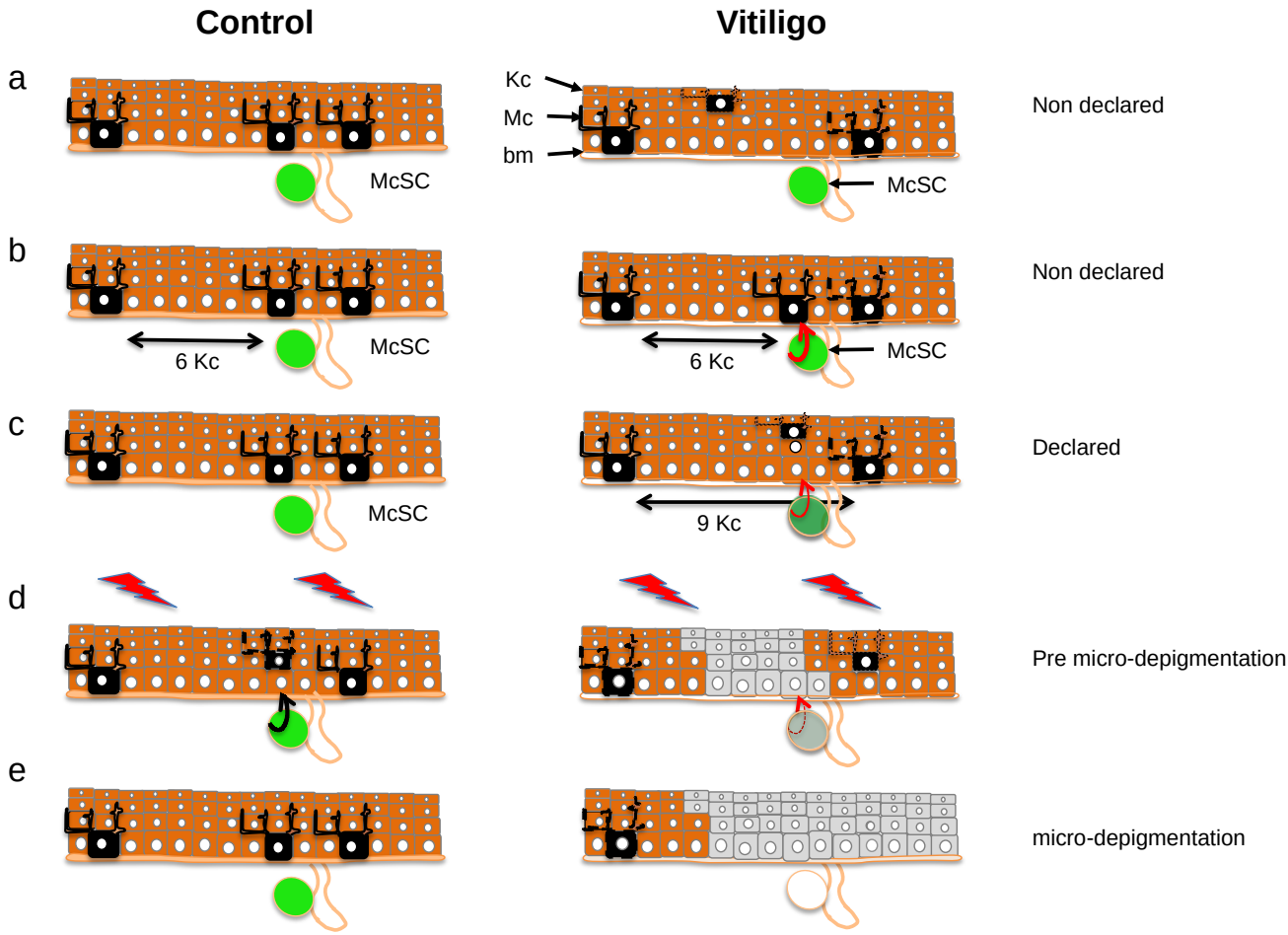


Figure S5 : Hypothesis for vitiligo initiation. a) Control and vitiligo epidermis are represented with their keratinocytes (Kc in brown with melanin and gray without melanin), melanocytes (Mc in black), basement membrane (bm) and the melanocyte stem cell (McSC). The intensity of the green indicates the potential of McSC in the reservoir. The presence of Mc in the upper layers of the epidermis ("flying" melanocytes) is normal in humans. b) Mc are replaced after activation of McSC. In vitiligo patients this event may be more frequent than in controls due to a weak Mc-Kc interaction as a consequence of the lower abundance of E-cadherin in Mc. This phase may occur before the onset of vitiligo.c) Once vitiligo has been initiated, the mean distance between two melanocytes is 9±0.4 keratinocytes, rather than 6±0.2 as observed in controls; the patients still do not show any detectable depigmentation in this area. Flying melanocytes are present and melanocytes continue to be replaced. The potential of MsSC may start to decline.d) These phenomena may be amplified by mechanical or chemical stress induction (symbolized with a red flash), leading to greater melanocyte detachment and McSC recruitment, and to a pre micro-depigmentation status. e) There is cellular compensation until the McSC reservoir is empty; this leads to the absence of melanocytes and micro-depigmentation of the skin. These initiation steps are followed by cell non-autonomous events during vitiligo progression including, principally, the activation of the immunological system.

Patient id	Gender	Age	Biopsies	Onset (years)	Site(s) of depigmentation
3	Female	41	buttock	1	face, fingers
4	Female	29	armpit	18	face, hands, feet, knees
6	Male	44	thigh	1	hands
7	Female	46	buttock	8	hands, fore-arms, feet, elbows, trunk, legs
8	Male	49	thigh	16	face, elbows, knees, feet
9	Female	50	buttock	1	chin, hand, feet
10	Female	39	buttock	1	face, hand, belly
11	Male	53	buttock	1	face, hands
12	Male	57	buttock	19	face, hands, wrists, trunk, knees
14	Female	34	buttock	20	face, hands, wrists, feet, thumbs
15	Female	48	buttock	1	face, legs
16	Female	67	buttock	2	face, hands
18	Female	20	buttock	6	hands, wrists
20	Female	29	buttock	1	face
22	Male	52	buttock	8	face, arm, hands
25	Male	56	buttock	1	legs, fore-arms
33	Female	29	buttock	2	hands, wrists
34	Female	37	buttock	8	hands, feet, trunk
35	Female	58	buttock	4	face, hands, trunk
36	Female	41	buttock	6	face, hands, armpit
37	Female	48	buttock	12	face, hands, legs, armpit
38	Female	61	buttock	8	face, hands, arms, legs
39	Female	38	buttock	3	face, armpit
42	Female	58	buttock	3	face, hands
43	Female	49	buttock	6	face, thigh, feet, hands
44	Male	37	buttock	5	face, arms, legs, trunk
45	Female	41	buttock	8	arms, legs, feet
46	Male	59	buttock	15	universalis
49	Female	50	buttock	15	universalis
n=29	**8 M, 21 F**	**46**		**7**	

Control id	Gender	Age	Biopsies	Onset (years)	Site(s) of depigmentation
1	Male	65	thigh	-	-
2	Male	67	thigh	-	-
24	Female	20	mammary	-	-
30	Female	40	mammary	-	-
31	Female	55	mammary	-	-
32	Female	50	mammary	-	-
41	Female	38	mammary	-	-
50	Male	35	thigh	-	-
60	Male	28	buttock	-	-
61	Male	30	buttock	-	-
n=10	**5 M, 5 F**	**43**			

Table S1: Characteristics of vitiligo (upper panel) and control (lower panel) patients. The mean duration of the disease for the vitiligo group was 7 years (range 1-20 years). The mean ages of vitiligo patients and controls were 46 and 43 years respectively (range 20-67 years for both). Note that in all cases, the site of biopsies were distant from the sites of depigmentation, even for the patients #46 and #49 who presented with large areas of depigmentation, referred to as *universalis*, but had pigmented buttocks.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : phénotype de pigmentation dû à l'invalidation de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes

Contexte et objectifs

E-CADHÉRINE est une protéine transmembranaire de la famille des cadhérines, responsable de l'adhésion cellulaire (Niessen et al., 2011). Nous avons pu mettre en évidence que la perte de la E-CADHÉRINE membranaire dans les mélanocytes des patients atteints de Vitiligo est un événement précoce favorisant le détachement des mélanocytes de la lame basale (Wagner et al., 2015). Ce défaut de E-CADHÉRINE peut être présent de façon intrinsèque dès la naissance et lors du développement embryonnaire chez les patients puisqu'un polymorphisme du gène codant pour la E-CADHÉRINE associé à cette pathologie à été découvert (Tarlé et al., 2015). La E-CADHÉRINE est essentielle dans le développement embryonnaire précoce, car sa perte chez la souris induit une létalité embryonnaire au stade blastocyste (Larue et al., 1994). Elle est également essentielle à la mise en place et au maintien de la structure de l'épiderme au cours du développement puisque sa perte induit une perte des jonctions serrés et une perte de la barrière épidermique conduisant à la mort des souris mutantes (K14-Cre/° ; Ecad F/F) (Tunggal et al., 2005). Nous nous sommes intéressés au rôle de la E-CADHÉRINE dans le développement embryonnaire des mélanoblastes. Nous avons généré des souris invalidées pour la protéine E-CADHÉRINE (Tyr::Cre/°;Ecad F/F= ΔEcad) dans le lignage mélanocytaire (cf annexe1) (Boussadia et al., 2002; Delmas et al., 2003). Le transgène utilisé (Tyr ::Cre/°) possède le promoteur de la tyrosinase et est exprimé dès E10.5 dans les CCN (Puig et al., 2009). Ces souris ΔEcad ont permis de démontrer que E-CADHÉRINE est nécessaire au maintien des mélanocytes à la lame basale de l'épiderme en présence de stress mécanique et oxydatif (Wagner et al., 2015). Ces souris présentent une dépigmentation de la queue due à une réduction de la prolifération des mélanoblastes et par conséquence une diminution du nombre de mélanocytes présents à la naissance (Figure 4 Wagner et al., 2015). Les souris ΔEcad présentent des phénotypes additionnels de la pigmentation, une tache blanche sur le ventre et une dépigmentation des pattes. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'établissement de la pigmentation des pattes (2^{e} partie de la présente partie résultats). L'étude du modèle murin ΔEcad m'a permis d'établir la distribution des mélanoblastes dans cette région au cours du développement embryonnaire et de mettre en évidence que E-CADHÉRINE est nécessaire pour une colonisation complète des mélanoblastes sur les membres.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Partie 2 : LA STABILISATION DE β-CATÉNINE DANS LE LIGNAGE MÉLANOCYTAIRE AFFECTE SPÉCIFIQUEMENT LES MÉLANOBLASTES MIGRANT DORSO-VENTRALEMENT

2.1. Contexte et objectifs

L'activation de la voie WNT / β-CATÉNINE est essentielle dans la détermination du destin cellulaire de certains dérivés des cellules des crêtes neurales (CCN) comme les neurones sensoriels et les mélanocytes (Hari et al., 2002, 2012). L'invalidation de *β-caténine* dans les CCN pré-migratoires (Wnt1 ::Cre ; βcatenin$^{flox/flox}$) ou les mélanoblastes (Tyr ::Cre ; Δbcat) induit une disparition totale des mélanoblastes chez la souris (cf. annexe1), tandis que son activation dans les CCN migratoires (Sox10::Cre ; bcatΔex3) favorise le lignage mélanocytaire, montrant ainsi le rôle majeur de β-CATÉNINE dans la détermination des mélanoblastes (Lee et al., 2004; Hari et al., 2002, 2012; Luciani et al., 2011; Danielian et al., 1998; Simon et al., 2012). Au laboratoire, par une approche gain et perte-de-fonction chez la souris, nous avons montré le rôle essentiel de β-CATÉNINE dans l'expansion des mélanoblastes au cours du développement embryonnaire (Luciani et al., 2011). Dans cette étude, deux types de souris mutées pour *β-caténine* spécifiquement dans les mélanoblastes ont été généré (cf. annexe 1): la première présente une invalidation du gène de *β-caténine* (Tyr::Cre, Δbcat = mutant perte-de-fonction) tandis que la deuxième exprime une forme stabilisée, nucléaire de β-CATÉNINE (Tyr::Cre ; bcat^{sta} = mutant gain-de-fonction). Dans ces deux mutants, la mutation de *β-caténine* dépend de l'expression de la recombinase Cre possédant une partie du promoteur *tyrosinase* (Tyr ::Cre) (Delmas et al., 2003). L'expression de la Cre dans ce modèle a lieu vers E10.5 dans les mélanoblastes empruntant la voie dorso-latérale, soit après leur détermination (Puig et al., 2009; Dhomen et al., 2010). Les souris Tyr::Cre, Δbcat présentent une robe blanche, car l'invalidation de *β-caténine* a comme conséquence l'inhibition très forte de la prolifération cellulaire. D'une façon surprenante, les mutants Tyr::Cre ; bcat^{sta} dit « gain-de-fonction » pour β-CATÉNINE présentent une robe grise. Ce phénotype résulte d'une diminution de la prolifération des mélanoblastes au cours du développement embryonnaire et par conséquent d'une réduction de leur nombre. Au niveau moléculaire, nous avons montré au laboratoire que la forme activée, nucléaire de β-CATÉNINE active la transcription de *Mitf*. MITF est aussi capable de lier et d'inhiber l'activité transcriptionnelle de β-CATÉNINE au niveau des cibles *Cycline-D1* et *C-myc* qui sont nécessaires à la prolifération des mélanoblastes (Luciani et al., 2011). Ainsi, MITF et β-CATÉNINE contrôlent non seulement la détermination des mélanoblastes à partir des CCN, mais régulent également conjointement la prolifération de ces cellules au cours du développement. Ces expériences révèlent qu'une régulation fine de l'activité de β-CATÉNINE est requise pour une expansion optimum des mélanoblastes. Afin de mieux

comprendre la contribution de β-CATÉNINE au niveau spatio-temporel dans le développement des mélanocytes, nous avons produit des souris exprimant une forme constitutivement active de β-CATÉNINE dans les cellules Tyr ::Cre positives (Tyr ::Cre, bcatΔexon3$^{F/F}$=βcatΔex3). Ce mutant βcatΔex3 diffère du précédent Tyr::bcat^{sta} à de multiples niveaux. Tout d'abord, l'expression d'une forme stabilisée de β-CATÉNINE est produite non plus à partir du promoteur *tyrosinase* d'une construction transgénique artificielle, mais à partir des signaux de régulation transcriptionnels endogène de *β-caténine*. Ensuite, la forme stabilisée de β-CATÉNINE est générée par une délétion de l'exon 3 du gène *β-caténine*, éliminant les sites de phosphorylation par GSK-3β de la protéine β-CATÉNINE dans ce mutant ; tandis que ces sites sont seulement mutés dans le mutant Tyr::bcat^{sta}. La forme mutée de β-CATÉNINE dans le mutant βcatΔex3 est transcriptionnellement beaucoup plus active et détectable dans le noyau des mélanoblastes et des mélanocytes que la forme bcat^{sta}. Les souris βcatΔex3 ne présentent pas de phénotype de pigmentation au niveau de la robe, de la queue ou des oreilles, indiquant une production et une fonction normale des mélanocytes au niveau des follicules pileux, de l'épiderme et du derme. Cependant, ces souris βcatΔex3 montrent une hyperpigmentation des pattes au niveau palmoplantaire, alors que cette région ne présente pas de pigmentation chez les souris sauvages. Les mélanoblastes présents chez les mutants βcatΔex3 sont très proches des fibres nerveuses du derme, suggérant que ces mélanoblastes pourraient dériver des précurseurs des cellules de Schwann (SCPs) associées aux fibres nerveuses, autre source de production de melanoblastes proposée par Adameyko (Adameyko et al., 2009). En effet, même s'il est classiquement admis que les mélanoblastes dérivent des CCN migrant dorso-latéralement des somites vers la périphérie de l'embryon, une autre source de production de mélanoblastes a été suggérée à partir des SCPs suivant la voie dorso-ventrale de migration . Cette seconde vague de mélanoblastes est fortement associée aux projections nerveuses chez le poulet, le poisson zèbre et la souris (Adameyko et al., 2009, 2012; Dooley et al., 2013). Comme cela a été présenté dans l'introduction, cette étude reste très controversée mais est en accord avec l'existence d'une seconde vague de migration des mélanoblastes suggérée par des observations antérieures (Mackenzie et al., 1997; Jordan and Jackson, 2000b; Niwa et al., 2002).

Notre hypothèse est que les mélanoblastes présents au niveau palmoplantaire dans les mutants β catΔex3 dérivent des SCPs de la voie ventrale. L'activation importante de la signalisation β-CATÉNINE dans les cellules exprimant Tyr ::Cre à partir du stade embryonnaire E10.5 n'affecterait pas l'expansion des mélanoblastes issus de la voie dorso-latérale mais celle des mélanoblastes qui dérivent des SCPs de la voie dorso-ventrale.

2.2. Résultats

Les résultats obtenus jusqu'à présent seront présentés sous la forme d'un article (Article 2). Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de compléter cette étude et seront réalisées pour la soutenance de thèse.

Article 2 : β-catenin differentially affects melanoblast development in the skin of the trunk and the paws. S. Colombo*, R.Y. Wagner*, D. Champeval , I. Yajima, V. Delmas and L. Larue. *En préparation*

Article 2 :

β-CATENIN differentially affects melanoblast development in the skin of the trunk and the paws

β-catenin differentially affects melanoblast development in the skin of the trunk and the paws

Sophie COLOMBO[1]*, Roselyne Y. WAGNER[1]*, Delphine CHAMPEVAL[1], Ichiro YAJIMA[1], Véronique DELMAS[1] and Lionel LARUE[1$]

* These authors contributed equally

[1] Equipe de Développement normal et pathologique des mélanocytes, Inserm U1021 - UMR3347, Institut Curie Orsay, France.

[$] Corresponding author : lionel.larue@curie.fr

Keyword : β-catenin, pigmentation, melanoblasts, Schwann cell precursors, proliferation, cell fate.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Material and methods :

Transgenic mice generation and genotyping :

Mice with a conditional constitutive stabilization of β-catenin were generated by mating Tyr::CreA (Delmas et al., 2003) or Tyr ::CreERT2 transgenic mice (Yajima et al., 2006) with animals homozygous for a floxed allele of β-catenin, with LoxP sites flanking exons 3 (Δex3) (Harada et al., 1999). Transgenic mice were on a pure C57BL/6 background (backcrossed at least 10 times). All animals were housed in specific pathogen-free conditions within the animal facility. Mice were genotyped using DNA isolated from tail biopsies with standard PCR conditions. The Tyr::Cre transgene (0.4 kb fragment) was detected by PCR, as previously described (Delmas et al., 2003). For detection of the floxed (570bp) and wild-type (376bp) alleles of the β-catenin gene, PCR amplification was carried out with the forward primer (LL523) 5'-GACACCGCTGCGTGGACAATG-3' and the reverse primer (LL524) 5'-GTGGCTGACAGCAGCTTTTCTG-3'. The forward primer (LL667) 5'-CGTGGACAATGGCTACTCA-3' and the reverse primer (LL668) 5'-CTGAGCCCTAGTCATTGCAT-3' were used for detection of the wild-type (715bp) and deleted (450bp) alleles of the β-catenin gene. The PCR conditions were as follows: 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 56.5°C, 45 s at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C.

Histology of the paws :

Mice were crossed with Dct::LacZ (Mackenzie et al., 1997) and the resulting embryos were collected at various time during pregnancy. Embryos were stained with X-gal, as previously described (Delmas et al., 2003). Newborn paws at P1 were dissected, washed in PBS, and fixed by incubation in 0.25% glutaraldehyde in PBS for 50 minutes at 4°C. They were then incubated in 30% sucrose/PBS overnight, followed by 30% sucrose/50% OCT/PBS for 5 hours and embedded in Optimal Cacodylate Compound (OCT). Cryosections (8µm thick) were stained either stained with hematoxylin and eosin or with X-gal as follows: they were washed twice in PBS at 4°C, and incubated twice, for 10 minutes, in permeabilization solution (0.1M phosphate buffer pH 7.3, 2 mM MgCl2, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40) at room temperature. They were then incubated in staining solution (0.4 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactosidase, 2 mM potassium ferricyanide, 2 mM potassium ferrocyanide and 4 mM MgCl2, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40 in PBS) overnight at 30°C. Sections were post-fixed in 4% PFA overnight at 4°C, washed in PBS and stained with eosin. Newborn paws at P5 were fixed in 4% PFA, dehydrated and embedded in paraffin by standard methods. Paraffin sections (7µm thick) were stained with eosin.

Immunostaining :

Mice were crossed with Dct::LacZ and embryos were collected at various developmental times. Newborn skins were dissected from the back of the mice. Embryos and skins were washed in PBS and fixed by overnight incubation in 4% PFA. They were then incubated in 30% sucrose/PBS overnight, followed by 30% sucrose/50% OCT/PBS for 5 h and embedded

in OCT. Cryosections (7µm thick) were washed with PBS-Tween 0.1% (PBT) for 10 minutes Antigens were then retrieved by incubation for 20 minutes in citric acid buffer (pH 7.4) at 90°C. Non-specific binding was blocked by incubation with 2% skimmed milk powder in PBT. Sections were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies. Rabbit polyclonal antibody against β-catenin (Abcam) and chicken polyclonal antibody against β-galactosidase (Abcam) were used. Sections were washed three times in PBST for 5 minutes each and incubated with secondary antibodies for 1 hour at 37°C. The secondary antibodies used were donkey Alexa 488-anti-rabbit and donkey Alexa 555-anti-chicken (Molecular Probes). Sections were incubated in DAPI for 10 minutes, washed 3 times in PBT, for 10 minutes each, and mounted in mounting media containing N-propylgalate. Conventional fluorescence photomicrographs were obtained with a Leica DM IRB inverted routine microscope. Figures were assembled with Photoshop.

Tamoxifen injection :
Pregnant c57Bl/6 mice of the choosen genotype (Tyr::CreERT2; Δex3F/F; Dct ::LacZ/+) were injected intraperitonnaly at E10.5 with tamoxifen (Sigma) diluted in corn oil. The dose used was 0 0.5mg/20g of body weight. Higher doses were tested but induced embryonic death and resorption of the embryos.

GFP Immunostaining :
Tyr ::Cre/°; Z/EG/+ or Tyr ::CreERT2 ; Z/EG/+ embryos were generated by mating Tyr ::Cre/° mice (Delmas et al., 2003) or TyrCreERT2/° mice (Yajima et al., 2006) with mice homozygous for Z/EG transgene (Novak et al., 2000). E14.5 or E15.5 embryos were fixed in 4% PFA-PBS pH7.5 (Euromedex) for 1h30 at 4°C, washed 3 times with PBS (Euromedex). Embryos were incubated in 30% sucrose (Gibco) for 4 hours and then 30% sucrose 50% OCT compound (Miles Bayer) for over night at 4°C and embedded in 100% OCT and sectionned at 7µm. Sections were washed twice in PBS-Tween20 0.1% (v/v) (VWR) for 10min, then incubated with NH4Cl 50mM-PBS (VWR-Merck) for 15min. Sections were washed twice in PBS-Tween 0.1% and incubated 15min with PBS-SDS 1% (Gibco) for antigen retrieval. Samples were washed three times for 5min in PBS-Tween 0.1%. Blocking were performed with 5% Donkey serum (Chemicon), 1% Bovine serum albumine (Sigma) for 30min at room temperature. Sections were incubated over night at 4°C with primary antibodies diluted in the blocking solution. Antibodies were specific for GFAP (antibody conjugated to cyanine3, C9205, Sigma), eGFP (A-P-R#06, Curie platform), Mitf (R&D system AF5769), Tuj1-alexa488 from mouse (Covance A488-435L-0100) and secondary antibody was AlexaFluor555 A21432 Invitrogen) and AlexaFluor 488 (A21206 Invitrogen). Samples were washed three times for 5min in PBS Tween 0.1%. Secondary antibody and DAPI (Sigma) were incubated in the blocking solution for 1hour at room temperature. Samples were washed three times for 5min in PBS Tween 0.1% and for 5min with H2O. Slides were mounted using Vectashield (Vector). Fluorescence photomicrographs were obtained with a Leica-DM-IRB (Nanterre, France) inverted microscope

Whole mount immunostaining :

Embryo between stage E13.5 and E15.5, were collected, the paw dissected and fixed in 4% PFA-PBS pH7.5 (Euromedex) for 6 hours. Wash 3 times in PBT. Deshydrate in PBS methanol 25%/50%/75%/100% for 10min each. Then do a 24 hours incubation in methanol at 4°C and bleach for 24h in 1/3 H_2O_2(VWR) 30% 2/3 methanol (VWR). Wash 3 times in methanol then post-fix overnight in 1/5 DMSO (Euromedex) + 4/5 methanol. Rehydrate the sample in PBS methanol 75%/50%/25% for 10 min each. Wash 2 times in PBT and block overnight with PBS 5% Donkey serum, 1% BSA and 20% DMSO at room temperature. Incubate the primary antibody in the blocking solution at 1/1000 for 5 days. Primary antibodies used : Rabbit against Neurofilament (Abcam ab9034), Mouse against GFAP (Sigma C9205 et Cell Signalling Technology 3670) and goat against Mitf (R&D system AF5769). Secondary antibody in the blocking solution was alexaFluor 555 (Invitrogen A-31572), alexaFluor488 (Invitrogen A21202) and alexaFluor633 (Invitrogen A-21082) for overnight at room temperature. Add Dapi for 4 hours at room temperature. Embryos were deshydrated in PBS methanol 25%/50%/75%/100% for 10min each. Chambers made by 1mm thick Fastwell (Sigma) coated on a glass slide was used. The paw was attached to the glass slide with 1% Nu Sieve Agarose (Sigma) and covered with methanol. After 3 washes with methanol incubate 2 times for 5min with methanol 50% BABB (1/3 benzylalcohol – 2/3 benzylbenzoate) (Sigma). Incubation with BABB 100% 3 times was realized for 5min each and until the sample is cleared. The chamber was closed with coverslip and sealed with nail polish.

Confocal imaging and ImageJ treatment for 3D reconstruction :

Images were acquired every 5 µm for the dorsal and ventral part of the limb with a Confocal Leica SP5 microscope. Then, the pluggin PureDenoise were used on the stack to increase the signal, and finally the filter substract background (20) were used to remove the remaining backgroung. 3D reconstruction were made from stacks containing the same number of slides and the same biological structures in the wt and the mutants, using 3D project in ImageJ without interpolation.

Melanoblast counts on the paw :

Xgal stained paw were taken in pictures using a binocular magnifiying glass with a 1x objective. Area 1 (from the body to the migrating front) and area 2 (after the migrating front) were drawn on the picture. Blue dots (melanoblasts) were counted using ImageJ software. At least 5 embryos were counted for each genotype at each stages in both areas. Statisticals analysis were made with Prism 5 software.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Par soucis de confidentialité les données non publiées ont été retirées de cette version et remplacées par des pages blanches.

Références:

Adameyko, I., and Lallemend, F. (2010). Glial versus melanocyte cell fate choice: Schwann cell precursors as a cellular origin of melanocytes. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 67, 3037–3055.

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

Adameyko, I., Lallemend, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S.S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lübke, M., et al. (2012). Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. Dev. Camb. Engl. 139, 397–410.

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes Dev. *20*, 3426–3439.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell *149*, 1192–1205.

Curran, K., Lister, J.A., Kunkel, G.R., Prendergast, A., Parichy, D.M., and Raible, D.W. (2010). Interplay between Foxd3 and Mitf regulates cell fate plasticity in the zebrafish neural crest. Dev. Biol. *344*, 107–118.

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

Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. Genes Dev. *21*, 2923–2935.

Denat, L., and Larue, L. (2007). [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. Bull. Cancer (Paris) *94*, 81–92.

Dooley, C.M., Mongera, A., Walderich, B., and Nüsslein-Volhard, C. (2013). On the embryonic origin of adult melanophores: the role of ErbB and Kit signalling in establishing melanophore stem cells in zebrafish. Dev. Camb. Engl. *140*, 1003–1013.

Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. Nature *396*, 370–373.

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

Dupin, E., Glavieux, C., Vaigot, P., and Le Douarin, N.M. (2000). Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 7882–7887.

Dupin, E., Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P., and Le Douarin, N.M. (2003). Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 5229–5233.

Fox, M.H. (1949). Analysis of some phases of melanoblast migration in the barred Plymouth Rock embryos. Physiol. Zool. *22*, 1–22.

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

Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. EMBO J. *18*, 5931–5942.

Hirobe, T. (1984). Histochemical survey of the distribution of the epidermal melanoblasts and melanocytes in the mouse during fetal and postnatal periods. Anat. Rec. *208*, 589–594.

Hari, L., Brault, V., Kléber, M., Lee, H.-Y., Ille, F., Leimeroth, R., Paratore, C., Suter, U., Kemler, R., and Sommer, L. (2002). Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. J. Cell Biol. *159*, 867–880.
Hari, L., Miescher, I., Shakhova, O., Suter, U., Chin, L., Taketo, M., Richardson, W.D., Kessaris, N., and Sommer, L. (2012). Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/β-catenin signaling. Dev. Camb. Engl.

Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. Cell *74*, 395–404.

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.

Imbert, A., Eelkema, R., Jordan, S., Feiner, H., and Cowin, P. (2001). Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. J. Cell Biol. *153*, 555–568.

Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. Nature *389*, 966–970.

Janssens, S., Van Den Broek, O., Davenport, I.R., Akkers, R.C., Liu, F., Veenstra, G.J.C., Hoppler, S., Vleminckx, K., and Destrée, O. (2013). The Wnt signaling mediator tcf1 is required for expression of foxd3 during Xenopus gastrulation. Int. J. Dev. Biol. *57*, 49–54.

Jordan, S.A., and Jackson, I.J. (2000b). A late wave of melanoblast differentiation and rostrocaudal migration revealed in patch and rump-white embryos. Mech. Dev. *92*, 135–143.
Knecht, A.K., and Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. Nat. Rev. Genet. *3*, 453–461.

Kunisada, T., Yoshida, H., Yamazaki, H., Miyamoto, A., Hemmi, H., Nishimura, E., Shultz, L.D., Nishikawa, S., and Hayashi, S. (1998). Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. Dev. Camb. Engl. *125*, 2915–2923.

Lee, H.-Y., Kléber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M.M., Kemler, R., and Sommer, L. (2004). Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. Science *303*, 1020–1023.

Luciani, F., Champeval, D., Herbette, A., Denat, L., Aylaj, B., Martinozzi, S., Ballotti, R., Kemler, R., Goding, C.R., De Vuyst, F., et al. (2011). Biological and mathematical modeling of melanocyte development. Dev. Camb. Engl. *138*, 3943–3954.

Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., and Jackson, I.J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. Dev. Biol. *192*, 99–107.

Nitzan, E., Pfaltzgraff, E.R., Labosky, P.A., and Kalcheim, C. (2013b). Neural crest and Schwann cell progenitor-derived melanocytes are two spatially segregated populations similarly regulated by Foxd3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 12709–12714.

Perlin, J.R., Lush, M.E., Stephens, W.Z., Piotrowski, T., and Talbot, W.S. (2011). Neuronal Neuregulin 1 type III directs Schwann cell migration. Development *138*, 4639–4648.

Romagnolo, B., Berrebi, D., Saadi-Keddoucci, S., Porteu, A., Pichard, A.L., Peuchmaur, M., Vandewalle, A., Kahn, A., and Perret, C. (1999). Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin. Cancer Res. *59*, 3875–3879.

Silvers, W.K. (1979). The Coat Colors of Mice: A Model for Mammalian Gene Action and Interaction (New York, NY: Springer).

Steingrímsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. Annu. Rev. Genet. *38*, 365–411.

Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Price, E.R., Cui, J., Lessnick, S.L., Wu, M., He, X., and Fisher, D.E. (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. J. Cell Biol. *158*, 1079–1087.

Wu, J., Saint-Jeannet, J.-P., and Klein, P.S. (2003). Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. Trends Neurosci. *26*, 40–45.

Yajima, I., Belloir, E., Bourgeois, Y., Kumasaka, M., Delmas, V., and Larue, L. (2006). Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. Genes. N. Y. N 2000 *44*, 34–43.

Yajima, I., Colombo, S., Puig, I., Champeval, D., Kumasaka, M., Belloir, E., Bonaventure, J., Mark, M., Yamamoto, H., Taketo, M.M., et al. (2013). A subpopulation of smooth muscle cells, derived from melanocyte-competent precursors, prevents patent ductus arteriosus. PloS One *8*, e53183.

Yamaguchi, Y., Itami, S., Watabe, H., Yasumoto, K.-I., Abdel-Malek, Z.A., Kubo, T., Rouzaud, F., Tanemura, A., Yoshikawa, K., and Hearing, V.J. (2004). Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. J. Cell Biol. *165*, 275–285.

Yamaguchi, Y., Passeron, T., Hoashi, T., Watabe, H., Rouzaud, F., Yasumoto, K., Hara, T., Tohyama, C., Katayama, I., Miki, T., et al. (2008). Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *22*, 1009–1020.

DISCUSSION

DISCUSSION :

Partie 1 – Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE dans le Vitiligo

Le Vitiligo est une pathologie pigmentaire due à la perte des mélanocytes de l'épiderme conduisant à l'apparition de zones dépigmentées. L'une des hypothèses expliquant la disparition des mélanocytes dans le Vitiligo, est un défaut d'adhésion de ces cellules ou mélanocytorrhagie. Ce défaut d'adhésion induit un détachement des mélanocytes de la lame basale puis leur élimination par migration trans-épidermique. L'adhésion entre mélanocytes et kératinocytes de l'épiderme est dépendante de la protéine E-CADHÉRINE. Ainsi, nous avons étudié les altérations éventuelles dans l'expression et la distribution de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes, avant la disparition de ces derniers, c'est-à-dire au niveau de la peau pigmentée des patients. **Notre hypothèse de départ était que les mélanocytes de l'épiderme pigmenté des patients atteints de Vitiligo auraient un défaut dans l'expression et la distribution de la E-CADHÉRINE.**

Le défaut d'adhésion des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence un déficit au niveau des marquages membranaires des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE dans les mélanocytes de la peau pigmentée des patients. Une diminution de l'expression de la E-CADHÉRINE a également été mise en évidence dans les kératinocytes de l'épiderme de la peau lésionnelle des patients (Kim and Lee, 2010). Nous avons montré que la peau pigmentée des patients présente également un grand nombre de mélanocytes dans les couches suprabasales de l'épiderme par rapport aux contrôles. Nous avons montré qu'une déficience en E-CADHÉRINE associée à un stress oxydatif ou mécanique induit un détachement des mélanocytes de la lame basale. Une étude récente a mis en évidence l'existence d'un polymorphisme du gène *Cdh1* codant pour la E-CADHÉRINE associé au Vitiligo (Tarlé et al., 2015). La déficience en E-CADHÉRINE serait donc un événement précoce dans l'étiologie de cette pathologie. On peut se demander si cette altération de la E- CADHÉRINE est spécifique ou s'il existe d'autres protéines membranaires affectées dans le Vitiligo. Nous avons observé que l'expression de la P-CADHÉRINE est normale dans la peau pigmentée des patients et des études sur les intégrines n'ont pas observé de différences dans l'expression de ces protéines dans la peau lésionnelle, périlésionnelle et pigmentée entre des patients atteints de Vitiligo et des contrôles sains (Le Poole et al., 1997; Bordignon et al., 2013). Cependant, une étude a montré que l'expression de *Ddr1,* une protéine impliquée dans l'attachement des mélanocytes à la lame basale, est perturbée dans les zones lésionnelles des patients atteints de

Vitiligo (Ricard et al., 2012). L'absence de la protéine CCN3, ligand de DDR1, dans les mélanocytes induit leur détachement dans des modèles de peaux reconstruites, comme celle de E-CADHÉRINE (Ricard et al., 2012). Des variants génétiques d'autres protéines membranaires ont été mis en évidence dans les gènes *Ddr1* et *Smoc2*, ce dernier étant un gène codant pour une protéine impliquée dans l'adhésion avec la MEC (Alkhateeb et al., 2010, 2013; Birlea et al., 2010; Silva de Castro et al., 2010). Il semblerait donc qu'il existe un déficit intrinsèque de l'expression de certaines protéines d'adhésion dans l'épiderme des patients atteints de Vitiligo. Ce déficit en protéines d'adhésion induit, sous l'effet de certains facteurs environnementaux, le détachement des mélanocytes de la lame basale. Des études complémentaires concernant d'autres protéines d'adhésion, comme SMOC2, au niveau des mélanocytes de la peau pigmentée permettront de comprendre l'ampleur du déficit d'adhésion des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo.

Un polymorphisme des gènes *Cdh1* et *Ddr1* mais pas de déficit d'adhésion global

Certains patients présentent des polymorphismes des gènes codant pour des protéines d'adhésion comme *Ddr1* et *Cdh1* (Silva de Castro et al., 2010; Tarlé et al., 2015). Nous pouvons alors supposer que ces patients possèdent une diminution globale dans l'organisme de l'expression de *Ddr1* et *Cdh1*. Les protéines d'adhésion participent à la formation des jonctions cellulaires et permettent le maintien de la cohésion tissulaire de l'organisme (Marrs and Nelson, 1996; Tinkle et al., 2008). E-CADHÉRINE est responsable de la formation des jonctions adhérentes tandis que DDR1 est impliquée dans l'attachement des mélanocytes à la lame basale (Fukunaga-Kalabis et al., 2006; Tinkle et al., 2008; Ricard et al., 2012). On peut se demander pourquoi les patients ne présentent pas de symptômes liés à une diminution de l'expression des protéines d'adhésion dans d'autres tissus et d'autres types cellulaires que les mélanocytes. La première hypothèse est celle de la compensation par d'autres protéines d'adhésion de la même famille. Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de compensation par une surexpression de la P-CADHÉRINE, présente dans les cellules de la lame basale de l'épiderme, dans les mélanocytes des patients et des souris. Il ne semble donc pas y avoir de compensation protéique par une autre cadhérine. La seconde hypothèse est que la diminution de l'expression de *Cdh1* est compensée par la présence d'autres jonctions cellulaires comme les jonctions serrées, les desmosomes ou les jonctions communicantes. Pour l'instant, il n'y a pas eu d'études concernant ces autres jonctions cellulaires dans l'épiderme des patients atteints de Vitiligo ; on pourrait cependant en attendre une information complémentaire concernant la spécificité de l'atteinte de la E-CADHÉRINE. Dans l'épiderme, les kératinocytes possèdent des jonctions serrées, communicantes, adhérentes et des desmosomes, en revanche, les mélanocytes présentent uniquement des jonctions adhérentes et communicantes dont la mise en place est dépendante de la présence des jonctions adhérentes (Niessen, 2007). Les mélanocytes possédant un nombre moins important de types différents de jonctions intercellulaires pourraient être plus sensibles à une

diminution de la présence des jonctions adhérentes, ce qui expliquerait que la cohésion des tissus ne soit pas affectée par une diminution de l'expression de *Cdh1*.

Les causes de la diminution de l'expression membranaire de E-CADHÉRINE

Nous avons pu voir que la diminution de l'expression de la E-CADHÉRINE membranaire peut avoir une origine génétique (Tarlé et al., 2015). Il est également possible que les patients puissent avoir une perturbation dans l'expression des régulateurs du gène *Cdh1*. Nous avons réalisé en collaboration une étude génétique sur une cohorte de patients islandais atteints de Vitiligo en ciblant les régulateurs connus de l'expression de *Cdh1*. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de polymorphisme génétique associé au Vitiligo. Ces résultats n'excluent pas l'existence d'une modification de la régulation épigénétique de l'expression de *Cdh1* (miARN ou défaut de méthylation).

Il apparaît donc, semble-t-il, que les patients atteints de Vitiligo souffrent d'un déficit d'adhésion intrinsèque. Cependant, leurs mélanocytes ne sont pas tous détachés, ce qui suggère l'intervention de facteurs extrinsèques capables d'induire le détachement des mélanocytes de la lame basale. Nous avons observé qu'une déficience en E-CADHÉRINE n'induit pas à elle seule un détachement des mélanocytes. Si, en revanche, elle est associée à un stress oxydatif ou mécanique, on observe un détachement des mélanocytes de la lame basale. Nous avons également pu mettre en évidence qu'un stress oxydatif (H_2O_2) induit une diminution de l'expression membranaire de la E-CADHÉRINE de mélanocytes normaux dans des peaux reconstruites et dans des cellules de mélanomes (MNT1). Il semblerait donc que le stress oxydatif participe également à la perte de l'adhésion en déstabilisant la E-CADHÉRINE membranaire subsistante dans les mélanocytes des patients. Le stress oxydatif peut induire la déstabilisation de la E-CADHÉRINE membranaire selon plusieurs mécanismes :

1. Un stress oxydatif (H_2O_2 ou xanthine) appliqué *in vitro* sur des cellules épithéliales normales ou cancéreuses (HB4a et Caco-2) induit la phosphorylation de la kinase SRC qui va à son tour phosphoryler le complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE, engendrant une dissociation des jonctions adhérente dans ces deux modèles et l'apoptose chez les cellules épithéliales non cancéreuses (Rao et al., 2002; Chan et al., 2010).
2. Il a été montré par ailleurs que la membrane des mélanocytes des patients était peroxydée, ce qui pourrait également déstabiliser l'organisation des protéines membranaires (Dell'Anna et al., 2007a). Cette peroxydation des membranes due au stress oxydatif rend les mélanocytes plus sensibles à une stimulation apoptotique *in vitro* (Dell'Anna et al., 2007a).
3. Le stress oxydatif peut entraîner une perturbation de la fonction de la CALMODULINE, une protéine pouvant lier le calcium et dont le partenaire majeur est IQGAP1 une protéine de type RasGAPs (Li et al., 1999). Les patients atteints de

Vitiligo ont une altération de la fonction ainsi qu'une diminution de l'expression de la CALMODULINE dans la peau lésionnelle (Schallreuter et al., 2007). La diminution de la quantité de CALMODULINE entraîne la fixation d'IQGAP1 au complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE puis la déstabilisation des jonctions adhérentes (Li et al., 1999).

Ainsi, le stress oxydatif active de nombreuses réponses cellulaires induisant *in fine* la déstabilisation des jonctions adhérentes mais également le déclenchement de l'apoptose suite à cette déstabilisation.

Le stress oxydatif ou le déficit de calcium ne sont pas les seuls facteurs extrinsèques agissant sur l'expression de E-CADHÉRINE puisque des facteurs solubles tels que l'EDN-1 ou bien TNF-alpha répriment l'expression de *Cdh1* dans des cellules de mélanomes et de carcinomes colorectaux (Jamal, 2000; Bigatto et al., 2015). Il a été montré que les patients atteints de Vitiligo présentent une augmentation de ces deux protéines dans la peau lésionnelle comparativement à la peau non lésionnelle (Imokawa, 2004; Lee, 2012). Plusieurs types de facteurs extrinsèques peuvent donc participer à la déstabilisation de la E-CADHÉRINE induisant un déficit d'adhésion des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo.

Le défaut d'adhésion des mélanocytes chez les patients atteints de Vitiligo et le déclenchement de l'apoptose

Nous avons observé que 50% des mélanocytes dans les couches supérieures de l'épiderme sont apoptotiques (CASPASE-3 clivée positives). Nous venons de voir que le stress oxydatif rend les mélanocytes plus sensibles à une stimulation apoptotique *in vitro* et il a été montré qu'un stress oxydatif déstabilisant le complexe E-CADHÉRINE / β-CATÉNINE déclenche l'apoptose chez les cellules épithéliales non cancéreuses (Rao et al., 2002; Dell'Anna et al., 2007a; Chan et al., 2010). AQP3 est une protéine impliquée dans l'hydratation, capable de s'associer aux niveau des contacts cellulaires avec E-CADHÉRINE (Fukunaga-Kalabis et al., 2006; Nejsum and Nelson, 2007; Hara-Chikuma and Verkman, 2008). Dans la peau lésionnelle des patients atteints de Vitiligo, une diminution des marquages de l'AQP3 est observée par rapport à la peau pigmentée (Kim and Lee, 2010). L'origine de cette diminution d'AQP3 n'est pas connue. Cependant, il a été montré qu'une extinction de l'*Aqp3* induit une diminution de la quantité de E-CADHÉRINE. Cette diminution de l'expression de l'AQP3 dans le Vitiligo réduit la survie des kératinocytes en induisant une activation des protéines AKT et PI3K, protéines impliquées dans la signalisation apoptotique (Kim and Lee, 2010; Maiese et al., 2012). Il a été mis en évidence que E-CADHÉRINE est capable d'activer directement la signalisation PI3K/AKT et d'induire la prolifération cellulaire (De Santis et al., 2009). En revanche, l'absence de E-CADHÉRINE dans les kératinocytes induit leur mort cellulaire par apoptose via l'activation de PI3K/AKT (Calautti et al., 2005). Ainsi, une perte de l'adhésion cellulaire des mélanocytes pourrait induire leur apoptose.

Un défaut d'adhésion des mélanocytes et les autres théories de la pathogénie du Vitiligo

Le Vitiligo est une pathologie polygénique, multifactorielle avec des composantes auto-immunes, oxydatives et neurales. Il est donc important de replacer le défaut d'adhésion des mélanocytes dans le contexte global de cette pathologie. Nous avons mis en évidence que les mélanocytes des patients présentent un défaut d'adhésion précoce de la E-CADHÉRINE au niveau de la peau pigmentée des patients. La diminution de l'expression membranaire de la E-CADHÉRINE peut être causée par un défaut intrinsèque génétique, mais elle peut également être affectée par le stress oxydatif extrinsèque présent au niveau de l'épiderme des patients (Rao et al., 2002; Tarlé et al., 2015). En outre, nous avons mis en évidence que le défaut d'adhésion des mélanocytes, associé à un stress oxydatif ou mécanique, induit le détachement des mélanocytes de la lame basale. Les mélanocytes des patients atteints de Vitiligo sont soumis à un environnement oxydatif et exposés à des métabolites toxiques (Cucchi et al., 2000; Dell'Anna et al., 2007a). Ces mélanocytes sont aussi plus sensibles à une stimulation apoptotique *in vitro* (Dell'Anna et al., 2007a). Nous avons observé que 50% des mélanocytes des couches suprabasales sont apoptotiques. Le Vitiligo est une pathologie multifactorielle avec une composante auto-immune, les patients possèdent des lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les mélanocytes, au niveau des zones périlésionnelles et lésionnelles (Le Poole et al., 2004). Nous avons pu observer des infiltrats de cellules CD3+ dans le derme et l'épiderme de la peau pigmentée des patients. La présence de mélanocytes apoptotiques dans les couches suprabasales de l'épiderme a pu induire l'activation d'une réponse immune acquise dirigée contre les mélanocytes. Le stress oxydatif peut aussi induire une réponse immune en activant la sécrétion par les mélanocytes de cytokines pro-inflammatoires activant les lymphocytes (Glassman, 2011; Yao et al., 2012). L'élimination progressive des mélanocytes, sous l'effet de la toxicité oxydative et par l'effet du système immunitaire, nécessite leur renouvellement fréquent par les MSC. Nous avons pu mettre en évidence un défaut dans la répartition des mélanocytes dans l'épiderme pigmentée des patients, suggérant un défaut du renouvellement des mélanocytes. Ainsi, chez les patients atteints de Vitiligo, la perte constante des mélanocytes peut provoquer un épuisement du réservoir des MSC et une dépigmentation. Des études complémentaires restent à réaliser afin de comprendre l'enchaînement des événements dans cette pathologie. Notre étude a montré pour la première fois que les mélanocytes de la peau pigmentée des patients sont altérés par rapport aux individus sains et que l'étude de la peau pigmentée des patients permet d'appréhender les événements précoces de cette pathologie (Picardo and Bastonini, 2015). Des études de la présence de cellules immunitaires ou d'un stress oxydatif au niveau de la peau pigmentée et perilésionnelle des patients, par référence à des donneurs sains, permettraient de comprendre plus précisément le rôle de ces deux composantes dans le déclenchement de cette pathologie et sa progression.

Le défaut d'adhésion et le renouvellement les cellules souches mélanocytaires

Au cours de notre étude sur le Vitiligo, nous avons pu mettre en évidence un déficit au niveau des marquages membranaires de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes des patients ainsi qu'un défaut dans le renouvellement des mélanocytes. Les mélanocytes de l'épiderme pigmenté des patients sont plus dispersés que les mélanocytes de l'épiderme des contrôles. L'existence d'un polymorphisme du gène *Cdh1* codant pour la E-CADHÉRINE associé au Vitiligo, nous fait supposer que tous les mélanocytes des patients, dont les MSC, peuvent exprimer moins de *Cdh1* dès la naissance (Tarlé et al., 2015). Dans notre modèle murin muté pour *E-cadhérine* (Tyr::Cre ;Ecad$^{F/F}$), les souris ont un pelage normal, une hypopigmentation des pattes et une légère hypopigmentation de la queue. Ce phénotype normal du pelage et léger au niveau de la queue montre que la perte de E-CADHÉRINE n'empêche pas d'avoir des mélanocytes dans l'épiderme de la queue et dans la partie proximale des pattes. On peut faire le parallèle avec les patients atteints de Vitiligo qui auraient une diminution de l'expression de *Cdh1* tout en présentant une pigmentation normale à la naissance. Dans notre modèle murin (Tyr::Cre ;Ecad$^{F/F}$), nous avons pu observer un blanchiment de la queue suite à des frictions répétées chez le mutant mais pas chez le wt, suggérant un défaut dans le renouvellement des MSC de l'épiderme, comme chez les patients, lors de la présence d'un stress exogène et d'une déficience en E-CADHÉRINE. Il serait intéressant d'étudier le rôle potentiel de E-CADHÉRINE dans le renouvellement des mélanocytes de l'épiderme à l'aide de ce modèle. Pour l'instant, trois niches de MSC qui ont été mises en évidence : le bulge du follicule pileux, les glandes sudoripares et l'épiderme interfolliculaire. Cependant, nos connaissances concernant le renouvellement des mélanocytes de l'épiderme chez l'Homme restent réduites. La E-CADHÉRINE est exprimée par les mélanocytes du follicule pileux et sa présence est nécessaire au renouvellement des poils (Pla et al., 2001; Young et al., 2003). Des données préliminaires nous indiquent que la perte de la E-CADHÉRINE dans les mélanocytes chez la souris (Tyr::Cre ;Ecad$^{F/F}$) n'est pas compensée par P-CADHÉRINE au niveau de l'épiderme et du follicule pileux. Il est possible que le défaut de la E-CADHÉRINE chez les patients participe non seulement au détachement des mélanocytes de la lame basale de l'épiderme mais impacte aussi leur renouvellement.

Partie 2 – Le rôle des protéines E-CADHÉRINE et ß-CATÉNINE lors du développement embryonnaire des mélanocytes

Nous avons pu mettre en évidence que les mélanocytes des patients atteints de Vitiligo présentaient une altération de l'expression membranaire de E-CADHÉRINE (Wagner et al., 2015). Cette altération peut être présente de façon intrinsèque dès la naissance et lors du développement embryonnaire chez les patients puisqu'un polymorphisme du gène codant pour la E-CADHÉRINE associé à cette pathologie à été découvert (Tarlé et al., 2015). Afin de comprendre la situation chez les patients qui présentent une diminution de l'expression de E-CADHÉRINE dans les mélanocytes, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une perte de E-CADHÉRINE dans le développement embryonnaire des mélanoblastes. Nous avons étudié le développement des mélanoblastes dans un modèle murin présentant une perte de la E-CADHÉRINE dans le linéage mélanocytaire (Tyr ::Cre ;$Ecad^{F/F}$ = ΔEcad). **Notre hypothèse est que la E-CADHÉRINE pourrait être impliquée dans le développement des mélanoblastes de la première vague.**

Les mélanoblastes dérivent des CCN migrant dorso-latéralement (première vague) ou dorso-ventralement (seconde vague) dans l'embryon. La voie WNT / β-CATÉNINE est essentielle dans la détermination, la migration et la prolifération des mélanoblastes migrant dorso-latéralement dans l'embryon (Hari et al., 2002, 2012; Luciani et al., 2011). L'invalidation de *β-caténine* dans les CCN pré-migratoires (Wnt1 ::Cre ; $βcatenin^{flox/flox}$) ou les mélanoblastes (Tyr ::Cre ; Δbcat) induit une disparition totale des mélanoblastes chez la souris (cf. annexe1), tandis que son activation dans les CCN migratoires (Sox10::Cre ; bcatΔex3) favorise le lignage mélanocytaire, montrant ainsi le rôle majeur de β-CATÉNINE dans la détermination des mélanoblastes (Lee et al., 2004; Hari et al., 2002, 2012; Luciani et al., 2011). Les effecteurs de la spécification des mélanoblastes de la voie dorso-latérale sont bien connus, cependant, ceux de la spécification des mélanoblastes migrant dorso-ventralement sont encore mal caractérisés. Nous avons donc réalisé une étude sur le rôle de la signalisation de β-CATÉNINE dans le développement des mélanoblastes de la voie dorso-ventrale. Nous avons étudié l'effet d'une expression d'une forme constitutivement active de β-CATÉNINE dans les cellules Tyr ::Cre positives (Tyr ::Cre, $bcatΔexon3^{F/F}$ =βcatΔex3) sur le devenir des mélanoblastes de cette voie. **Notre hypothèse est qu'une quantité importante de β-CATÉNINE nucléaire favoriserait la détermination des SCP vers les mélanoblastes.**

Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE dans la prolifération des mélanoblastes

Nous avons montré qu'une perte de E-CADHÉRINE dans les mélanoblastes (Tyr::Cre ;$Ecad^{F/F}$ = ΔEcad) induit une hypopigmentation des pattes chez la souris. Cette hypopigmentation est due à une réduction du nombre et du front de migration des mélanoblastes colonisant la patte dès E13.5, c'est-à-dire probablement la première vague des

mélanoblastes. Ce phénomène peut s'expliquer par une diminution de la prolifération des mélanoblastes qui seraient donc moins nombreux et pourraient coloniser une surface moins importante. Il a été montré au cours de l'étude sur le Vitiligo que les mélanoblastes mutants de l'épiderme de la queue présentent une diminution de la prolifération, les cellules sont bloquées en phase G0, conduisant à une hypopigmentation. Il reste cependant à déterminer s'il y a aussi une réduction de la prolifération au niveau des mélanoblastes dans les pattes. La E-CADHÉRINE en plus de ses fonctions d'adhésion pourrait également être impliquée dans la signalisation cellulaire. E-CADHÉRINE est capable de former un complexe membranaire avec certains récepteurs comme EGFR et IGF-1R dans des cellules épithéliales et de carcinome mammaire (Guvakova and Surmacz, 1997; Morali et al., 2001). De plus, E-CADHÉRINE est également capable d'activer directement la signalisation PI3K/AKT et d'induire la prolifération dans des cellules de carcinome ovarien (De Santis et al., 2009). Enfin, il a été mis en évidence récemment qu'une application d'une force mécanique, comme c'est le cas au cours du développement, induit une entrée dans le cycle cellulaire dépendant de la présence de E-CADHÉRINE à la membrane (Benham-Pyle et al., 2015). Cette pression mécanique induit la localisation de β-CATÉNINE et YAP1 dans le noyau puis l'activation de leurs signalisations respectives (Benham-Pyle et al., 2015). En revanche, en l'absence de E-CADHÉRINE, la cellule stimulée est bloquée en phase G1/S (Benham-Pyle et al., 2015). La perte de la E-CADHÉRINE membranaire peut également induire une augmentation de β-CATÉNINE dans le cytoplasme et le noyau des mélanoblastes perturbant ainsi la signalisation WNT/ β-CATÉNINE dans ces cellules. Il est possible qu'une perturbation de la quantité de β-CATÉNINE dans ces cellules influe sur la prolifération des mélanoblastes, comme nous allons le voir plus en détail dans la suite de cette discussion. Au cours du développement, les mélanoblastes migrent puis se divisent sous l'effet de facteurs extrinsèques, intrinsèques ou d'une pression mécanique. Il est possible qu'une perte de E-CADHÉRINE empêche la prolifération des mélanoblastes de la première vague dans l'épiderme, réduisant ainsi leur nombre et la zone que ces mélanoblastes vont pouvoir coloniser. Au laboratoire, des croisements de mutant ΔEcad avec des mutant $Nras^{Q61K}$, possédant une forme active de NRAS induisant la prolifération des cellules ont été réalisé. De façon surprenante, les mutants ΔEcad-$Nras^{Q61K}$ présentent toujours des pattes blanches et un ventre blanc. Ce phénotype indique que la perte de E-CADHÉRINE ne peut être compensée par une activation de la prolifération suggérant l'implication d'autres mécanismes dans ce phénotype.

Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE dans la migration des mélanoblastes

Il est également possible que la diminution de la zone colonisée par les mélanoblastes soit due à une capacité migratoire moins importante des mélanoblastes mutants. L'expression de E-CADHÉRINE a longtemps été associée à un phénotype épithélial anti-invasif, sa perte étant associée à la migration et à l'EMT, cependant des études récentes ont questionné le rôle de E-CADHÉRINE notamment dans la migration cellulaire (Rodriguez et al., 2012a; Shamir and

Ewald, 2015). La présence de E-CADHÉRINE est associée à des cas de cancers agressifs dans de nombreux organes, par exemple le cancer du sein et des ovaires (Auersperg et al., 1999; Kleer et al., 2001). Chez la drosophile au cours du développement, E-CADHÉRINE dirige la migration de cellules de la bordure ovarienne en cluster par son rôle de mécanorécepteur (Cai et al., 2014). Chez le poisson zèbre, il a été montré que E-CADHÉRINE contrôle les forces de tractions nécessaires à la migration cellulaire individuelle des cellules germinales (Kardash et al., 2010). Cette étude met en évidence que le niveau de E-CADHÉRINE est également important : une perte totale de E-CADHÉRINE empêche la migration et désorganise le front de migration tandis qu'une augmentation de E-CADHÉRINE ralenti la migration (Kardash et al., 2010). Donc E-CADHÉRINE pourrait être impliquée dans la migration individuelle des mélanoblastes de la première vague. Des expériences du suivi de la migration des mélanoblastes wt et mutant (Tyr::Cre ;$Ecad^{F/F}$) dans la peau des embryons *ex vivo* permettront de mettre en évidence un éventuel défaut de migration de ces mélanoblastes (Mort et al., 2010, 2014).

Le rôle de la protéine E-CADHÉRINE pour la présence des mélanoblastes dans l'épiderme

Nous avons observé que les mélanoblastes ne peuvent pas, semble-t-il, coloniser l'épiderme car il restent dans le derme à E15.5 et disparaissent à P1. Ainsi, E-CADHÉRINE semble être impliquée dans la localisation dans l'épiderme des mélanoblastes. Pour l'instant, le rôle de E-CADHÉRINE a été uniquement mis en évidence dans les étapes tardives du développement des mélanocytes. Chez la souris à E10.5 au niveau du tronc, les mélanoblastes du derme provenant de la première vague n'expriment ni E-CADHÉRINE, ni N-CADHÉRINE, ni P-CADHÉRINE (Jouneau et al., 2000). E-CADHÉRINE ne commence à être exprimée par les mélanoblastes du derme qu'à partir de E12.5 (Jouneau et al., 2000). Il a également été montré que E-CADHÉRINE était présente dans les mélanoblastes de l'épiderme (Nishimura et al., 1999). Selon cette étude, la présence de E-CADHÉRINE serait nécessaire afin que la cellule puisse pénétrer dans l'épiderme ce qui rejoint nos observations. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'effet d'une perte de E-CADHÉRINE sur les propriétés invasives des mélanoblastes. Des expériences d'invasion *in vitro* dans du matrigel ou *in vivo* dans des souris nude utilisant des mélanoblastes provenant de la peau d'embryon wt et mutant ΔEcad permettra de mettre en évidence un éventuel défaut d'invasion des mélanoblastes ΔEcad.

L'autre question soulevée par ces observations est celle de la disparition des mélanoblastes du derme chez les mutants ΔEcad, indiquant que E-CADHÉRINE pourrait être impliquée dans la survie de ces cellules. Nous avons vu précédemment dans la partie sur l'effet de la perte de E-CADHÉRINE dans le Vitiligo, que cette perte peut induire le déclenchement de l'apoptose via la voie PI3K/AKT (Calautti et al., 2005). Il a également été montré que les fibroblastes et les kératinocytes de la peau, par la sécrétion de certains facteurs de manière autocrines ou paracrines, peuvent influer sur la différenciation, la prolifération et la survie des mélanocytes

(Duval et al., 2002, 2014; Imokawa, 2004). Nous avons précédemment décrit dans cette discussion que la E-CADHÉRINE a également des fonctions dans la signalisation cellulaire par la formation de complexe membranaire avec certains récepteurs comme EGFR et IGF-1R (Guvakova and Surmacz, 1997; Morali et al., 2001). Il est donc possible que la perte de E-CADHÉRINE empêche l'intégration de certains signaux cellulaires trophiques provenant de l'environnement, induisant *in fine* la mort cellulaire des mélanoblastes.

L'adhésion dans la détermination des SCP

Certaines évidences suggèrent une implication du contact cellulaire dans la spécification des mélanoblastes *versus* les cellules de Schwann. Selon cette hypothèse, les SCP restant au contact des nerfs établissent des interactions cellulaires avec les neurones, ces interactions leur permettent de recevoir des signaux moléculaires induisant leur spécification en cellule de Schwann. En revanche, les cellules qui se détachent des nerfs échappent à cette programmation par les neurones et deviennent des mélanoblastes migrant le long des fibres nerveuses jusqu'à atteindre l'épiderme (Adameyko et al., 2009). E-CADHÉRINE est une protéine d'adhésion exprimée par les mélanocytes de la peau et les cellules de Schwann chez l'adulte (Tang et al., 1994; Fannon et al., 1995). E-CADHÉRINE pourrait avoir un rôle dans l'adhésion des SCP sur les nerfs et dans leur spécification. Si *E-cadhérine* n'est plus exprimée par les SCP, on s'attend, selon cette hypothèse, à avoir un détachement des SCP des nerfs ce qui induirait une augmentation du nombre de mélanoblastes au détriment des cellules de Schwann. Dans nos mutants (Tyr::Cre ;Ecad$^{F/F}$), *E-cadhérine* n'est plus exprimée ni dans le lignage mélanocytaire ni dans le lignage glial. On observe une perte du marquage E-CADHÉRINE dans les mélanocytes de l'épiderme de la queue et dans les cellules de Schwann des nerfs sciatiques chez le mutant adulte (données non présentées). Mais, nous n'observons pas d'augmentation du nombre de mélanoblastes et des résultats préliminaires indiquent qu'il n'y a pas non plus d'effet sur le nombre de cellules de Schwann de ces mutants. Ainsi, E-CADHÉRINE ne semble pas impliquée dans la spécification des SCP dépendante de l'adhésion. Il se pourrait qu'une autre protéine d'adhésion soit impliquée. Les cellules de Schwann précurseurs expriment N-CADHÉRINE, par la suite l'expression de N-CADHÉRINE diminue au profit de E-CADHÉRINE, lorsque les SCP vont se différentier en cellule de Schwann mature (Wanner et al., 2006; Corell et al., 2010). Le processus d'échange de N-CADHÉRINE en faveur de E-CADHÉRINE n'est pas très bien connu mais serait dépendant du contact avec les neurones et de la signalisation de l'AMP cyclique (Crawford et al., 2008). Après la naissance, les cellules de Schwann continuent d'exprimer E-CADHÉRINE (Fannon et al., 1995). Ainsi, il sera intéressant d'étudier la fonction de N-CADHÉRINE dans la spécification des SCP. Est-ce qu'une perte de l'expression de cette protéine induirait une différenciation préférentielle vers les mélanocytes ou bien un défaut de migration des SCP sur les nerfs ?

β-CATÉNINE est-elle l'effecteur de la détermination des mélanoblastes ou le chef d'orchestre de la détermination des SCP ?

Nous avons pu mettre en évidence qu'une stabilisation de la protéine β-CATÉNINE induit une hyperpigmentation des pattes due à la présence de mélanocytes ectopiques dans le derme. Ces mélanocytes ectopiques sont dus à une augmentation du nombre de mélanoblastes au détriment du nombre de cellules de Schwann à partir de E14.5. Ainsi, une forte stimulation de la voie WNT induit une différenciation préférentielle des SCP vers les mélanoblastes. Le rôle exact de β-CATÉNINE reste à préciser : est-elle uniquement impliquée dans la détermination des mélanoblastes ou bien a-t-elle un rôle dans la détermination des SCP à la fois en cellule de Schwann et en mélanoblastes ?

Il est possible qu'une activation de la voie WNT soit uniquement nécessaire à la détermination des mélanoblastes et que la détermination des cellules de Schwann nécessite l'action d'autres protéines. β-CATÉNINE est capable d'activer la transcription de *M-Mitf* et d'interagir directement avec MITF pour activer ses cibles transcriptomiques (Widlund et al., 2002; Schepsky et al., 2006). Il a été montré que l'expression de *M-Mitf* est suffisante pour établir un destin mélanocytaire (Lister et al., 1999). β-CATÉNINE est capable d'activer la transcription de *M-Mitf* et d'interagir directement avec MITF pour activer ses cibles transcriptomiques (Widlund et al., 2002; Schepsky et al., 2006). Avec MITF, la seconde protéine impliquée dans la détermination du lignage mélanocytaire est le récepteur tyrosine kinase KIT (Opdecamp et al., 1997; Wehrle-Haller, 2003). Des mutants exprimant de façon ectopique son ligand KIT-L dans l'épiderme (hk14-SLF) présentent une hyperpigmentation des pattes au niveau ventral, comme nos mutants βcatΔex3 (Kunisada et al., 1998). Ces évidences suggèrent un lien entre ces deux protéines et leurs signalisations respectives dans la spécification des mélanoblastes dérivant des SCP. Il serait intéressant d'observer les mélanoblastes et les cellules de Schwann de la voie dorso-ventrale dans ces mutants (hk14-SLF) afin de déterminer le rôle de KIT dans la spécification de cette seconde vague. Les autres protéines impliquées dans la spécification des mélanoblastes depuis les SCP sont IGF1 et PDGF et il a été montré que l'EDN-3 est capable de trans-différencier des cellules de Schwann en mélanocytes (Dupin et al., 2003; Adameyko et al., 2009). Il a été montré que la signalisation WNT est capable d'activer la transcription d'*Igf1* dans les neurones et les pré-adipocytes *in vitro* (Longo et al., 2002; Kim et al., 2011). Il a également été montré que la signalisation WNT est capable d'activer la transcription d'*Edn3* (Schwartz et al., 2003; Zirn et al., 2006). Chez les mutants βcatΔex3, β-CATÉNINE pourrait favoriser la détermination des mélanoblastes en augmentant la transcription de ses cibles *Igf1, Edn3* et surtout *M-Mitf*. Ainsi, la spécification des SCP vers les mélanoblastes serait dépendante de l'activation de l'expression par β-CATÉNINE de ses différentes cibles transcriptomiques, tandis que la spécification des cellules de Schwann serait dépendante d'autres effecteurs comme la protéine FOXD3 (Nitzan et al., 2013b).

Une autre possibilité est que β-CATÉNINE orchestre la détermination des SCP en amont, par le niveau d'activation qu'elle va exercer sur ces gènes cibles. Une faible activation de la voie WNT induirait un destin glial et une forte activation un destin mélanocytaire. L'activation de la signalisation de β-CATÉNINE par le même transgène bcatΔex3 a déjà été impliquée dans la détermination des CNN vers différents lignages (Lee et al., 2004; Hari et al., 2012). Une activation précoce de la signalisation β-CATÉNINE dans les CCN pré-migratoires (Wnt1::Cre ; bcatΔex3) favorise le lignage neuronal sensoriel au détriment du lignage mélanocytaire (Hari et al., 2002). En revanche, une activation plus tardive dans les CCN migratoires (Sox10::Cre ; bcatΔex3) favorise le lignage mélanocytaire, avec l'apparition de mélanocytes ectopiques dans les organes cibles des autres lignages (Lee et al., 2004; Hari et al., 2012). De plus, les protéines WNT et leurs récepteurs sont exprimés au niveau des nerfs à partir de E12.5 chez la souris, soit au moment de la spécification des SCP (Grigoryan et al., 2013). La signalisation WNT est également présente dans les cellules de Schwann immatures où β-caténine va diriger le tri radial et favoriser la différenciation des cellules de Schwann (Grigoryan et al., 2013). Enfin, la détermination des SCP en cellules de Schwann est dépendante de la protéine FOXD3 qui agit notamment en empêchant l'activation de l'expression de *M-Mitf* par PAX3 (Thomas and Erickson, 2009; Curran et al., 2009, 2010; Nitzan et al., 2013b). Il a été montré que l'activation de l'expression de *FoxD3* est nécessaire pour induire un destin glial et sa répression est nécessaire pour induire un destin mélanocytaire (Kos et al., 2001; Nitzan et al., 2013b). Mais nous ignorons par quels mécanismes la régulation de l'expression ou de la répression de *FoxD3* est effectuée au cours de la détermination. L'expression de *FoxD3*, codant pour une protéine essentielle dans la spécification des SCP, est activée par TCF1, un co-facteur de β-CATÉNINE dans le mésoderme (Janssens et al., 2013). Cette même étude a aussi mis en évidence une fixation de β-CATÉNINE en amont du locus du gène *FoxD3* mais ne mentionne pas un rôle activateur ou répresseur de cette protéine. Le rôle répresseur de β-CATÉNINE sur l'expression de *Foxd3* pourrait avoir lieu de deux manières : une répression active de ce gène ou passive par la présence de β-CATÉNINE sur l'ADN, empêchant la fixation de facteurs de transcription activateurs. Ainsi, au niveau temporel et moléculaire, il est possible que β-CATÉNINE dirige la spécification des SCP vers les lignages gliaux et mélanocytaires par son action sur les gènes *M-Mitf* ou *FoxD3*. Afin de tester cette hypothèse, il faudra observer les cellules de Schwann des modèles murins possédant différents niveaux d'activation de la voie WNT, par exemple le modèle Tyr ::Cre ; bcat^{sta} qui possède une activation moindre de la voie WNT que Tyr::Cre ; bcatΔex3. L'effet transcriptionnel de β-CATÉNINE sur le promoteur de *FoxD3* dans les mélanoblastes ou les mélanocytes devra faire l'objet d'une étude particulière.

Le rôle de β-CATÉNINE dans la prolifération cellulaire

β-CATÉNINE possède de nombreux gènes cibles, plus de 100 gènes ont été identifiés à ce jour dans différents lignages (http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes). Dans ces cibles se trouvent des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme *Myc, CyclinD1, Brn-2* ou encore *Mitf*. MITF est un facteur de transcription

responsable de nombreuses fonctions au sein du lignage mélanocytaire, comme nous avons pu le voir. Son rôle dans la prolifération cellulaire est complexe puisque selon son niveau d'expression, MITF est capable d'induire ou d'inhiber la prolifération (Carreira et al., 2005, 2006). MITF est capable d'inhiber l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire $p27^{KIP1}$ favorisant ainsi la prolifération, et d'activer l'inhibiteur du cycle cellulaire $p21^{CIP1}$ induisant un ralentissement du cycle cellulaire (Carreira et al., 2005, 2006). MITF est aussi capable de provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S par l'activation de $p16^{INK4}$ (Loercher 2005). Une modulation de l'expression de *Mitf* peut avoir un effet pro ou anti-prolifératif.

Il a été montré au laboratoire que la modulation de la signalisation de β-CATÉNINE au cours du développement embryonnaire des mélanoblastes avait des effets divers sur l'activation de *Mitf* (Luciani et al., 2011). L'inactivation de *β-caténine* dans les mélanoblastes (Tyr ::Cre ; Δ^{bcat}) induit une diminution de l'expression de *M-Mitf in vivo,* tandis qu'une activation faible de la signalisation de β-CATÉNINE (Tyr ::Cre ; $bcat^{sta}$) induit une augmentation de l'expression de *M-Mitf in vivo* (Luciani et al., 2011). Cependant, dans les deux cas, une diminution de la prolifération cellulaire est observée, associée à une absence de pigmentation (Tyr ::Cre ; Δbcat) ou une hypopigmentation du pelage (Tyr ::Cre ; $bcat^{sta}$). Dans notre cas, selon nos expériences préliminaires, il semble qu'une forte activation de la signalisation β-CATÉNINE (Tyr ::Cre ; bcatΔex3) n'ait pas d'effet sur la prolifération cellulaire des deux vagues de mélanoblastes et nous n'observons pas de phénotype au niveau du pelage. Il sera intéressant d'étudier l'expression de *Mitf* dans les mélanoblastes de ce modèle murin afin de comprendre l'effet d'une augmentation de β-CATÉNINE sur son expression. De plus, il a été montré que MITF est capable d'interagir directement avec β-CATÉNINE, modulant ainsi son activité transcriptionnelle (Schepsky et al., 2006). Une étude de l'expression des cibles transcriptomiques de β-CATÉNINE et MITF impliquées dans la prolifération (*CyclinD1, p27, Myc,..)* est également à envisager afin de comprendre la régulation de la prolifération par ces deux protéines. La multiplicité des cibles de MITF et β-CATÉNINE, et les fonctions antagonistes de ces cibles sur la prolifération, complexifie les prédictions et l'analyse d'une modulation de la signalisation de β-CATÉNINE. La compréhension de la régulation de la prolifération permettrait de comprendre les effets d'une modulation de la signalisation WNT dans la transformation tumorale.

Les territoires anatomiques colonisés par les deux vagues de mélanoblastes

Dans notre étude de la fonction des protéines E-CADHÉRINE et β-CATÉNINE au cours du développement embryonnaire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la seconde vague des mélanoblastes. A E13.5, nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules ventrales GFAP+/MITF+/NF- proches des nerfs, tandis qu'à E14.5, nous observons des cellules exprimant uniquement GFAP+ ou MITF+. Ces résultats semblent suggérer que la détermination des précuseurs bipotents gliaux/mélanocytaires a lieu vers E14 dans les pattes

avant chez la souris. Des marquages complémentaires comme PLP, BABP ou TUJ1 peuvent être réalisés afin de déterminer plus précisément la nature de ces cellules.

Après avoir mis en évidence que les mélanoblastes peuvent dériver des SCP, le groupe ayant réalisé cette étude a affirmé que la majorité des mélanoblastes du tronc et des pattes dérivent des SCP (Adameyko et al., 2009; Adameyko and Lallemend, 2010). Cette affirmation semble restrictive si l'on tient compte des nombreuses études sur la pigmentation, selon lesquelles des mélanoblastes provenant de la première vague colonisent et persistent dans le tronc (Mackenzie et al., 1997; Douarin and Kalcheim, 1999; Jordan and Jackson, 2000b; Wilkie et al., 2002; Luciani et al., 2011). Dans nos mutants stabilisant β-CATÉNINE dans les mélanocytes (Tyr ::Cre ; bcatΔex3), le phénotype observé se situe principalement du côté ventral des pattes, il y a un léger effet au niveau distal du côté dorsal et il n'y a pas d'effet au niveau du tronc. Une autre étude sur le poulet a mis en évidence, en éliminant le TN après l'émergence des mélanoblastes de la première vague, que cette seconde vague colonise majoritairement les parties hypaxiales/ventrales de l'embryon (Nitzan et al., 2013b). Nos résultats semblent plutôt en accord avec cette dernière étude. Selon nos observations, la seconde vague des mélanoblastes peuple majoritairement le coté ventral des pattes. Une étude permettant de suivre spécifiquement chacune des deux vagues permettra de répondre de façon claire à cette question. L'utilisation d'un modèle murin inductible tel que Tyr ::Cre^{ERT2} ou Dct ::Cre^{ERT2} qui sera induit au moment de la détermination des mélanoblastes de la première (E8.5) et de la seconde vague (E10.5-E11.5) permettra de déterminer les territoires peuplés par ces deux types de mélanoblastes.

L'importance de la double origine des mélanoblastes pour les mélanocytes adultes et la transformation tumorale

L'existence d'un lien embryonnaire entre les mélanocytes et les cellules de Schwann est également retrouvée au cours de la transformation maligne des mélanocytes ou des cellules de Schwann. Des mélanomes extra-cutanés, sans association avec des anomalies pigmentaires cutanées, peuvent apparaître dans les ganglions nerveux ou les nerfs périphériques et représentent 5% des mélanomes (Hussein, 2008). La synthèse de pigments est la caractéristique principale du lignage mélanocytaire. Cependant, certaines tumeurs rares du système nerveux périphérique qui ne sont pas des mélanomes, vont produire de la mélanine et être pigmentées (S100+, MELAN A +, Tyr +) : les schwannomes mélanotiques (1% des tumeurs des cellules de Schwann) et les neurofibromes mélanotiques (tumeurs des cellules de Schwann) (Kaehler et al., 2008; Rodriguez et al., 2012b). D'autres types de cancers, d'origine cellulaire inconnue, sont composés d'une population hétérogène de cellules dont des mélanocytes pigmentés (S100+, HMB-45+) comme les tumeurs de Bednar (dermato-fibrosarcome protubérant pigmenté) ou encore l'hamartome neurocristique cutané (tumeur du neuromésenchyme) (Mezebish et al., 1998). Ces tumeurs posent des difficultés lors du diagnostic car elles sont histologiquement similaires au mélanome métastatique et expriment

certains des marqueurs typiques du mélanome (HMB-45, S100, TYR, MELAN A). L'agressivité et l'origine de ces tumeurs sont mal connues. Malgré les récentes découvertes sur la détermination des lignages mélanocytaires et gliaux, la transformation maligne donnant naissance à ce type de tumeur hétérogène est inconnue. L'existence d'une population souche chez l'adulte, capable de donner naissance à ces deux lignages, peut constituer une source cellulaire pour la formation de tumeurs hétérogènes mais cela reste à démontrer.

Compte tenu de la double origine des mélanoblastes au cours du développement, il est possible que les mélanocytes de la peau résultants de ces deux populations embryonnaires soient différents. La seconde vague de mélanoblastes coloniserait les parties hypaxiales (ventrales) de l'embryon dont les paumes font parties (Nitzan et al., 2013b). Chez l'embryon humain, une étude a comparé l'expression protéique de marqueurs mélanocytaires (DCT, HMB-45, MITF, TYR, MELAN A) dans les mélanocytes de l'épiderme selon leur localisation (paume, dos, abdomen, crâne) (Nakamura et al., 2015). Cette étude a montré que les mélanocytes de l'épiderme des paumes n'expriment pas les mêmes marqueurs que ceux des autres régions de l'organisme (Nakamura et al., 2015). Une disparité dans l'expression des gènes selon la localisation du mélanocyte est aussi observée après une transformation tumorale, ainsi les mélanomes acraux (paumes) sont distingués des mélanomes se formant sur le tronc par les mutations qu'ils possèdent (Piliang, 2011). L'origine des mélanoblastes conditionnerait donc l'expression génique des mélanocytes adultes qu'ils forment ainsi que des éventuels mélanomes en résultant. Cependant, des études complémentaires restent à réaliser pour mesurer à quel point ces populations mélanocytaires de la peau sont différentes.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE :

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.

Achilleos, A., and Trainor, P.A. (2012). Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. Cell Res. *22*, 288–304.

Adameyko, I., and Lallemend, F. (2010). Glial versus melanocyte cell fate choice: Schwann cell precursors as a cellular origin of melanocytes. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *67*, 3037–3055.

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

Adameyko, I., Lallemend, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S.S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lübke, M., et al. (2012). Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. Dev. Camb. Engl. *139*, 397–410.

Adişen, E., Karaca, F., Oztaş, M., and Gürer, M.A. (2008). Efficacy of local psoralen ultraviolet A treatments in psoriasis, vitiligo and eczema. Clin. Exp. Dermatol. *33*, 344–345.

Aeby, C. (1885). Die Herkunft des Pigments im Epithel. Med Zentralbl Wiss 273–275.

Agrawal, D., Shajil, E.M., Marfatia, Y.S., and Begum, R. (2004). Study on the antioxidant status of vitiligo patients of different age groups in Baroda. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *17*, 289–294.

Al'Abadie, M.S., Senior, H.J., Bleehen, S.S., and Gawkrodger, D.J. (1994). Neuropeptide and neuronal marker studies in vitiligo. Br. J. Dermatol. *131*, 160–165.

Alizadeh, A., Fitch, K.R., Niswender, C.M., McKnight, G.S., and Barsh, G.S. (2008). Melanocyte-lineage expression of Cre recombinase using Mitf regulatory elements. Pigment Cell Melanoma Res. *21*, 63–69.

Alkhateeb, A., Fain, P.R., Thody, A., Bennett, D.C., and Spritz, R.A. (2003). Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *16*, 208–214.

Alkhateeb, A., Fain, P.R., and Spritz, R.A. (2005). Candidate functional promoter variant in the FOXD3 melanoblast developmental regulator gene in autosomal dominant vitiligo. J. Invest. Dermatol. *125*, 388–391.

Alkhateeb, A., Al-Dain Marzouka, N., and Qarqaz, F. (2010). SMOC2 gene variant and the risk of vitiligo in Jordanian Arabs. Eur. J. Dermatol. EJD *20*, 701–704.

Alkhateeb, A., Marzouka, N.A.-D., and Tashtoush, R. (2013). Variants in PTPN22 and SMOC2 genes and the risk of thyroid disease in the Jordanian Arab population. Endocrine.

Allouche, J., Bellon, N., Saidani, M., Stanchina-Chatrousse, L., Masson, Y., Patwardhan, A., Gilles-Marsens, F., Delevoye, C., Domingues, S., Nissan, X., et al. (2015). In vitro modeling of hyperpigmentation associated to neurofibromatosis type 1 using melanocytes derived from human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 9034–9039.

Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. (2005). Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 17734–17738.

Amoh, Y., Mii, S., Aki, R., Hamada, Y., Kawahara, K., Hoffman, R.M., and Katsuoka, K. (2012). Multipotent nestin-expressing stem cells capable of forming neurons are located in the upper, middle and lower part of the vibrissa hair follicle. Cell Cycle Georget. Tex *11*, 3513–3517.

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.

Aoki, H., Yamada, Y., Hara, A., and Kunisada, T. (2009). Two distinct types of mouse melanocyte: differential signaling requirement for the maintenance of non-cutaneous and dermal versus epidermal melanocytes. Dev. Camb. Engl. *136*, 2511–2521.

Aoki, H., Tomita, H., Hara, A., and Kunisada, T. (2015). Conditional Deletion of Kit in Melanocytes: White Spotting Phenotype is Cell-Autonomous. J. Invest. Dermatol.

Arrunátegui, A., Arroyo, C., Garcia, L., Covelli, C., Escobar, C., Carrascal, E., and Falabella, R. (1994). Melanocyte reservoir in vitiligo. Int. J. Dermatol. *33*, 484–487.

Auersperg, N., Pan, J., Grove, B.D., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., Somasiri, A., and Roskelley, C.D. (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 6249–6254.

Azim, K., and Butt, A.M. (2011). GSK3β negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination in vivo. Glia *59*, 540–553.

Baggiolini, A., Varum, S., Mateos, J.M., Bettosini, D., John, N., Bonalli, M., Ziegler, U., Dimou, L., Clevers, H., Furrer, R., et al. (2015). Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. Cell Stem Cell *16*, 314–322.

Baker, C.V., and Bronner-Fraser, M. (1997). The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. Mech. Dev. *69*, 3–11.

Baroffio, A., Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (1988). Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 5325–5329.

Barona, M.I., Arrunátegui, A., Falabella, R., and Alzate, A. (1995). An epidemiologic case-control study in a population with vitiligo. J. Am. Acad. Dermatol. *33*, 621–625.

Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Cell adhesion. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β-catenin activation to drive cell cycle entry. Science *348*, 1024–1027.

Bigatto, V., De Bacco, F., Casanova, E., Reato, G., Lanzetti, L., Isella, C., Sarotto, I., Comoglio, P.M., and Boccaccio, C. (2015). TNF-α promotes invasive growth through the MET signaling pathway. Mol. Oncol. *9*, 377–388.

Birlea, S.A., Fain, P.R., and Spritz, R.A. (2008). A Romanian population isolate with high frequency of vitiligo and associated autoimmune diseases. Arch. Dermatol. *144*, 310–316.

Birlea, S.A., Gowan, K., Fain, P.R., and Spritz, R.A. (2010). Genome-wide association study of generalized vitiligo in an isolated European founder population identifies SMOC2, in close proximity to IDDM8. J. Invest. Dermatol. *130*, 798–803.

BISCHITZ, P.G., and SNELL, R.S. (1959). A study of the melanocytes and melanin in the skin of the male guinea-pig. J. Anat. *93*, 233–245.

Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., and Fuchs, E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. Cell *118*, 635–648.

Boissy, R.E., and Spritz, R.A. (2009). Frontiers and controversies in the pathobiology of vitiligo: separating the wheat from the chaff. Exp. Dermatol. *18*, 583–585.

Bonaventure, J., Domingues, M.J., and Larue, L. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res. *26*, 316–325.

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.

Boneva, N.B., Kaplamadzhiev, D.B., Sahara, S., Kikuchi, H., Pyko, I.V., Kikuchi, M., Tonchev, A.B., and Yamashima, T. (2011). Expression of fatty acid-binding proteins in adult hippocampal neurogenic niche of postischemic monkeys. Hippocampus *21*, 162–171.

Bordignon, M., Castellani, C., Fedrigo, M., Thiene, G., Peserico, A., Alaibac, M., and Angelini, A. (2013). Role of alpha5beta1 integrin and MIA (melanoma inhibitory activity) in the pathogenesis of vitiligo. J. Dermatol. Sci.

Boucneau, J., De Schepper, S., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Naeyaert, J.-M., and Lambert, J. (2005). Gene expression profiling of cultured human NF1 heterozygous (NF1+/-) melanocytes reveals downregulation of a transcriptional cis-regulatory network mediating activation of the melanocyte-specific dopachrome tautomerase (DCT) gene. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *18*, 285–299.

Boulais, N., and Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. Eur. J. Dermatol. EJD *18*, 119–127.

Boussadia, O., Kutsch, S., Hierholzer, A., Delmas, V., and Kemler, R. (2002). E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. Mech. Dev. *115*, 53–62.

Briganti, S., Caron-Schreinemachers, A.-L.D.B., Picardo, M., and Westerhof, W. (2012). Anti-oxidant defence mechanism in vitiliginous skin increases with skin type. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *26*, 1212–1219.

Bronner, M. (2015). Confetti clarifies controversy: neural crest stem cells are multipotent. Cell Stem Cell *16*, 217–218.

Bronner-Fraser, M. (2004). Development. Making sense of the sensory lineage. Science *303*, 966–968.

Bronner-Fraser, M., and Fraser, S.E. (1988). Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. Nature *335*, 161–164.

Bućan, M., Nagle, D.L., Hough, R.B., Chapman, V.M., and Lo, C.W. (1995). Lethality of Rw/Rw mouse embryos during early postimplantation development. Dev. Biol. *168*, 307–318.

Budi, E.H., Patterson, L.B., and Parichy, D.M. (2011). Post-embryonic nerve-associated precursors to adult pigment cells: genetic requirements and dynamics of morphogenesis and differentiation. PLoS Genet. *7*, e1002044.

Buonanno, A., and Fischbach, G.D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol. *11*, 287–296.

Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. Nat. Neurosci. *6*, 1162–1168.

Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. Mutat. Res. *571*, 3–17.

Cai, D., Chen, S.-C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choesmel-Cadamuro, V., Sawyer, J.K., Danuser, G., and Montell, D.J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. Cell *157*, 1146–1159.

Calautti, E., Li, J., Saoncella, S., Brissette, J.L., and Goetinck, P.F. (2005). Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. J. Biol. Chem. *280*, 32856–32865.

Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., and Jackson, R.B. (2008). Biology, 8th Edition (San Francisco: Pearson Benjamin Cummings).

Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell *161*, 1681–1696.

Cario-André, M., Pain, C., Gauthier, Y., and Taïeb, A. (2007). The melanocytorrhagic hypothesis of vitiligo tested on pigmented, stressed, reconstructed epidermis. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *20*, 385–393.

Carrasco, G.A., and Van de Kar, L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur. J. Pharmacol. *463*, 235–272.

Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.-D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C.R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. Nature *433*, 764–769.

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes Dev. *20*, 3426–3439.

Casp, C.B., She, J.-X., and McCormack, W.T. (2002). Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment

Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *15*, 62–66.

Chakraborty, D.P., Roy, S., and Chakraborty, A.K. (1996). Vitiligo, psoralen, and melanogenesis: some observations and understanding. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *9*, 107–116.

Chan, H.-L., Chou, H.-C., Duran, M., Gruenewald, J., Waterfield, M.D., Ridley, A., and Timms, J.F. (2010). Major role of epidermal growth factor receptor and Src kinases in promoting oxidative stress-dependent loss of adhesion and apoptosis in epithelial cells. J. Biol. Chem. *285*, 4307–4318.

Chang, C.-H., Tsai, R.-K., Tsai, M.-H., Lin, Y.-H., and Hirobe, T. (2014). The roles of Frizzled-3 and Wnt3a on melanocyte development: In vitro studies on neural crest cells and melanocyte precursor cell lines. J. Dermatol. Sci. *75*, 100–108.

Chateau, Y., and Misery, L. (2004). Connections between nerve endings and epidermal cells: are they synapses? Exp. Dermatol. *13*, 2–4.

Chen, G.-Y., Hsu, M.M.-L., Tai, H.-K., Chou, T.-C., Tseng, C.-L., Chang, H.-Y., Lan, C.-C.E., and Sheu, H.-M. (2005). Narrow-band UVB treatment of vitiligo in Chinese. J. Dermatol. *32*, 793–800.

Chi, G.F., Kim, D., Jiang, M.H., Yoon, K.J., and Son, Y. (2011). Schwann-like cells from human melanocytes and their fate in sciatic nerve injury. Neuroreport *22*, 603–608.

Cho, M., Ryu, M., Jeong, Y., Chung, Y.-H., Kim, D.-E., Cho, H.-S., Kang, S., Han, J.-S., Chang, M.-Y., Lee, C.-K., et al. (2009). Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. *390*, 500–505.

Choi, W., Wolber, R., Gerwat, W., Mann, T., Batzer, J., Smuda, C., Liu, H., Kolbe, L., and Hearing, V.J. (2010). The fibroblast-derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin. J. Cell Sci. *123*, 3102–3111.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell *149*, 1192–1205.

Colombo, S., Champeval, D., Rambow, F., and Larue, L. (2012). Transcriptomic analysis of mouse embryonic skin cells reveals previously unreported genes expressed in melanoblasts. J. Invest. Dermatol. *132*, 170–178.

Corell, M., Wicher, G., Limbach, C., Kilimann, M.W., Colman, D.R., and Fex Svenningsen, Å. (2010). Spatiotemporal distribution and function of N-cadherin in postnatal Schwann cells: A matter of adhesion? J. Neurosci. Res. *88*, 2338–2349.

Corfas, G., Velardez, M.O., Ko, C.-P., Ratner, N., and Peles, E. (2004). Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 9250–9260.

Crawford, A.T., Desai, D., Gokina, P., Basak, S., and Kim, H.A. (2008). E-cadherin expression in postnatal Schwann cells is regulated by the cAMP-dependent protein kinase a pathway. Glia *56*, 1637–1647.

Cucchi, M.L., Frattini, P., Santagostino, G., and Orecchia, G. (2000). Higher plasma catecholamine and metabolite levels in the early phase of nonsegmental vitiligo. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *13*, 28–32.

Curran, K., Raible, D.W., and Lister, J.A. (2009). Foxd3 controls melanophore specification in the zebrafish neural crest by regulation of Mitf. Dev. Biol. *332*, 408–417.

Curran, K., Lister, J.A., Kunkel, G.R., Prendergast, A., Parichy, D.M., and Raible, D.W. (2010). Interplay between Foxd3 and Mitf regulates cell fate plasticity in the zebrafish neural crest. Dev. Biol. *344*, 107–118.

Dammak, I., Boudaya, S., Ben Abdallah, F., Turki, H., Attia, H., and Hentati, B. (2009). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patients with stable and active vitiligo. Int. J. Dermatol. *48*, 476–480.

Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. Curr. Biol. CB *8*, 1323–1326.

Dell'Anna, M.L., Urbanelli, S., Mastrofrancesco, A., Camera, E., Iacovelli, P., Leone, G., Manini, P., D'Ischia, M., and Picardo, M. (2003). Alterations of mitochondria in peripheral blood mononuclear cells of vitiligo patients. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *16*, 553–559.

Dell'Anna, M.L., Ottaviani, M., Albanesi, V., Vidolin, A.P., Leone, G., Ferraro, C., Cossarizza, A., Rossi, L., and Picardo, M. (2007a). Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. J. Invest. Dermatol. *127*, 1226–1233.

Dell'Anna, M.L., Mastrofrancesco, A., Sala, R., Venturini, M., Ottaviani, M., Vidolin, A.P., Leone, G., Calzavara, P.G., Westerhof, W., and Picardo, M. (2007b). Antioxidants and narrow band-UVB in the treatment of vitiligo: a double-blind placebo controlled trial. Clin. Exp. Dermatol. *32*, 631–636.

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

Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. Genes Dev. *21*, 2923–2935.

Denat, L., and Larue, L. (2007). [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. Bull. Cancer (Paris) *94*, 81–92.

Denat, L., Kadekaro, A.L., Marrot, L., Leachman, S.A., and Abdel-Malek, Z.A. (2014). Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. J. Invest. Dermatol.

Deo, M., Huang, J.L.-Y., Fuchs, H., de Angelis, M.H., and Van Raamsdonk, C.D. (2012). Differential Effects of Neurofibromin Gene Dosage on Melanocyte Development. J. Invest. Dermatol.

Dhomen, N., Da Rocha Dias, S., Hayward, R., Ogilvie, L., Hedley, D., Delmas, V., McCarthy, A., Henderson, D., Springer, C.J., Pritchard, C., et al. (2010). Inducible expression of (V600E) Braf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. Pigment Cell Melanoma Res. *23*, 112–120.

Diwakar, G., Zhang, D., Jiang, S., and Hornyak, T.J. (2008). Neurofibromin as a regulator of

melanocyte development and differentiation. J. Cell Sci. *121*, 167–177.

Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1995). Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. Neuron *15*, 585–596.

Dooley, C.M., Mongera, A., Walderich, B., and Nüsslein-Volhard, C. (2013). On the embryonic origin of adult melanophores: the role of ErbB and Kit signalling in establishing melanophore stem cells in zebrafish. Dev. Camb. Engl. *140*, 1003–1013.

Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. Nature *396*, 370–373.

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

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

Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. Curr. Opin. Genet. Dev. *13*, 529–536.

Duband, J.-L. (2006). Neural crest delamination and migration: integrating regulations of cell interactions, locomotion, survival and fate. Adv. Exp. Med. Biol. *589*, 45–77.

Duband, J.-L. (2010). Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. Cell Adhes. Migr. *4*, 458–482.

Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. Dev. Biol.

Dupin, E., Glavieux, C., Vaigot, P., and Le Douarin, N.M. (2000). Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 7882–7887.

Dupin, E., Real, C., Glavieux-Pardanaud, C., Vaigot, P., and Le Douarin, N.M. (2003). Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 5229–5233.

Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Gonçalves-Trentin, A., and Le Douarin, N.M. (2007). Neural crest progenitors and stem cells. C. R. Biol. *330*, 521–529.

Duttlinger, R., Manova, K., Berrozpe, G., Chu, T.Y., DeLeon, V., Timokhina, I., Chaganti, R.S., Zelenetz, A.D., Bachvarova, R.F., and Besmer, P. (1995). The Wsh and Ph mutations affect the c-kit expression profile: c-kit misexpression in embryogenesis impairs melanogenesis in Wsh and Ph mutant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 3754–3758.

Dutton, K.A., Pauliny, A., Lopes, S.S., Elworthy, S., Carney, T.J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P., and Kelsh, R.N. (2001). Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. Dev. Camb. Engl. *128*, 4113–4125.

Duval, C., Smit, N.P.M., Kolb, A.M., Régnier, M., Pavel, S., and Schmidt, R. (2002). Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *15*, 440–446.

Duval, C., Cohen, C., Chagnoleau, C., Flouret, V., Bourreau, E., and Bernerd, F. (2014). Key

regulatory role of dermal fibroblasts in pigmentation as demonstrated using a reconstructed skin model: impact of photo-aging. PloS One *9*, e114182.

Elgoweini, M., and Nour El Din, N. (2009). Response of vitiligo to narrowband ultraviolet B and oral antioxidants. J. Clin. Pharmacol. *49*, 852–855.

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

Ezzedine, K., Gauthier, Y., Léauté-Labrèze, C., Marquez, S., Bouchtnei, S., Jouary, T., and Taieb, A. (2011). Segmental vitiligo associated with generalized vitiligo (mixed vitiligo): a retrospective case series of 19 patients. J. Am. Acad. Dermatol. *65*, 965–971.

Fannon, A.M., Sherman, D.L., Ilyina-Gragerova, G., Brophy, P.J., Friedrich, V.L., Jr, and Colman, D.R. (1995). Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. J. Cell Biol. *129*, 189–202.

Farrokhi, S., Hojjat-Farsangi, M., Noohpisheh, M.K., Tahmasbi, R., and Rezaei, N. (2005). Assessment of the immune system in 55 Iranian patients with vitiligo. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *19*, 706–711.

Felsten, L.M., Alikhan, A., and Petronic-Rosic, V. (2011). Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. J. Am. Acad. Dermatol. *65*, 493–514.

Fenton, K. (2015). The effect of cell death in the initiation of lupus nephritis. Clin. Exp. Immunol. *179*, 11–16.

Fernandes, K.J.L., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. Nat. Cell Biol. *6*, 1082–1093.

Ferreira Tojais, N., Peghaire, C., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Jaspard, B., Reynaud, A., Moreau, C., Couffinhal, T., Duplàa, C., and Dufourcq, P. (2014). Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes. Cardiovasc. Res. *103*, 291–303.

Fitzpatrick, T.B., and Breathnach, A.S. (1963). [THE EPIDERMAL MELANIN UNIT SYSTEM]. Dermatol. Wochenschr. *147*, 481–489.

Fitzpatrick, T.B., and Szabo, G. (1959). The melanocyte: cytology and cytochemistry. J. Invest. Dermatol. *32*, 197–209.

Fox, M.H. (1949). Analysis of some phases of melanoblast migration in the barred Plymouth Rock embryos. Physiol. Zool. *22*, 1–22.

Fruehauf, J.P., and Meyskens, F.L., Jr (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 789–794.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E.M., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. Nat. Cell Biol. *4*, 222–231.

Fukunaga-Kalabis, M., Martinez, G., Liu, Z.-J., Kalabis, J., Mrass, P., Weninger, W., Firth, S.M., Planque, N., Perbal, B., and Herlyn, M. (2006). CCN3 controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. J. Cell Biol. *175*, 563–

569.

Gallagher, S.J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2013). Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. Oncogene *32*, 2230–2238.

Gargoom, A.M., Duweb, G.A., Elzorghany, A.H., Benghazil, M., and Bugrein, O.O. (2004). Calcipotriol in the treatment of childhood vitiligo. Int. J. Clin. Pharmacol. Res. *24*, 11–14.

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

Gauthier, Y., Cario Andre, M., and Taïeb, A. (2003a). A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *16*, 322–332.

Gauthier, Y., Cario-Andre, M., Lepreux, S., Pain, C., and Taïeb, A. (2003b). Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. Br. J. Dermatol. *148*, 95–101.

van Geel, N., Speeckaert, R., Taieb, A., Picardo, M., Böhm, M., Gawkrodger, D.J., Schallreuter, K., Bennett, D.C., van der Veen, W., Whitton, M., et al. (2011). Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. Pigment Cell Melanoma Res. *24*, 564–573.

Gilbert, S.F. (2000). Developmental Biology (Sinauer Associates).

Glassman, S.J. (2011). Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. Clin. Sci. Lond. Engl. 1979 *120*, 99–120.

Glover, J.D., Knolle, S., Wells, K.L., Liu, D., Jackson, I.J., Mort, R.L., and Headon, D.J. (2015). Maintenance of distinct melanocyte populations in the interfollicular epidermis. Pigment Cell Melanoma Res. *28*, 476–480.

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

Goldstein, J., and Horsley, V. (2012). Home sweet home: skin stem cell niches. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *69*, 2573–2582.

Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R., and Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. EMBO J. *10*, 1135–1147.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron *39*, 749–765.

Green, S.A., Simoes-Costa, M., and Bronner, M.E. (2015). Evolution of vertebrates as viewed from the crest. Nature *520*, 474–482.

Greenhill, E.R., Rocco, A., Vibert, L., Nikaido, M., and Kelsh, R.N. (2011). An iterative genetic and dynamical modelling approach identifies novel features of the gene regulatory network underlying melanocyte development. PLoS Genet. *7*, e1002265.

Grichnik, J.M., Ali, W.N., Burch, J.A., Byers, J.D., Garcia, C.A., Clark, R.E., and Shea, C.R. (1996). KIT expression reveals a population of precursor melanocytes in human skin. J.

Invest. Dermatol. *106*, 967–971.

Grigoryan, T., Stein, S., Qi, J., Wende, H., Garratt, A.N., Nave, K.-A., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2013). Wnt/Rspondin/β-catenin signals control axonal sorting and lineage progression in Schwann cell development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 18174–18179.

Grimes, P.E., Morris, R., Avaniss-Aghajani, E., Soriano, T., Meraz, M., and Metzger, A. (2004). Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. J. Am. Acad. Dermatol. *51*, 52–61.

Grojean, M.F., Thivolet, J., and Perrot, H. (1982). [Acquired leukomelanoderma caused by topical depigmenting agents]. Ann. Dermatol. Vénéréologie *109*, 641–647.

Guo, F., Ma, J., McCauley, E., Bannerman, P., and Pleasure, D. (2009). Early postnatal proteolipid promoter-expressing progenitors produce multilineage cells in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 7256–7270.

Guvakova, M.A., and Surmacz, E. (1997). Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival, and promote E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in human breast cancer cells. Exp. Cell Res. *231*, 149–162.

Halbleib, J.M., and Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes Dev. *20*, 3199–3214.

Hara, M., Toyoda, M., Yaar, M., Bhawan, J., Avila, E.M., Penner, I.R., and Gilchrest, B.A. (1996). Innervation of melanocytes in human skin. J. Exp. Med. *184*, 1385–1395.

Hara-Chikuma, M., and Verkman, A.S. (2008). Roles of aquaporin-3 in the epidermis. J. Invest. Dermatol. *128*, 2145–2151.

Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. EMBO J. *18*, 5931–5942.

Hari, L., Brault, V., Kléber, M., Lee, H.-Y., Ille, F., Leimeroth, R., Paratore, C., Suter, U., Kemler, R., and Sommer, L. (2002). Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. J. Cell Biol. *159*, 867–880.

Hari, L., Miescher, I., Shakhova, O., Suter, U., Chin, L., Taketo, M., Richardson, W.D., Kessaris, N., and Sommer, L. (2012). Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/β-catenin signaling. Dev. Camb. Engl.

Hariharan, V., Klarquist, J., Reust, M.J., Koshoffer, A., McKee, M.D., Boissy, R.E., and Le Poole, I.C. (2010). Monobenzyl ether of hydroquinone and 4-tertiary butyl phenol activate markedly different physiological responses in melanocytes: relevance to skin depigmentation. J. Invest. Dermatol. *130*, 211–220.

Harning, R., Cui, J., and Bystryn, J.C. (1991). Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. J. Invest. Dermatol. *97*, 1078–1080.

Harris, M.L., and Erickson, C.A. (2007). Lineage specification in neural crest cell pathfinding. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *236*, 1–19.

Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and

connections to the actin cytoskeleton. Biochim. Biophys. Acta *1778*, 660–669.

Hazneci, E., Karabulut, A.B., Oztürk, C., Batçioğlu, K., Doğan, G., Karaca, S., and Eşrefoğlu, M. (2005). A comparative study of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and nitrate levels in vitiligo patients. Int. J. Dermatol. *44*, 636–640.

Hearing, V.J. (2007). Regulating melanosome transfer: who's driving the bus? Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *20*, 334–335.

Hearing, V.J. (2011). Milestone 3: Nat. Milest. E8–E11.

Hearn, R.M.R., Kerr, A.C., Rahim, K.F., Ferguson, J., and Dawe, R.S. (2008). Incidence of skin cancers in 3867 patients treated with narrow-band ultraviolet B phototherapy. Br. J. Dermatol. *159*, 931–935.

Heath, J.W., Wheater, P.R., Stevens, A., and Young, B. (2008). Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater (De Boeck Supérieur).

Henion, P.D., and Weston, J.A. (1997). Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. Dev. Camb. Engl. *124*, 4351–4359.

Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a002915.

Hirobe, T. (1984). Histochemical survey of the distribution of the epidermal melanoblasts and melanocytes in the mouse during fetal and postnatal periods. Anat. Rec. *208*, 589–594.

Hirobe, T. (2005). Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *18*, 2–12.

Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. Cell *74*, 395–404.

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., Panthier, J.J., and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. Dev. Camb. Engl. *127*, 5379–5389.

Hou, L., Pavan, W.J., Shin, M.K., and Arnheiter, H. (2004). Cell-autonomous and cell non-autonomous signaling through endothelin receptor B during melanocyte development. Dev. Camb. Engl. *131*, 3239–3247.

Hou, L., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2006). Interspecies difference in the regulation of melanocyte development by SOX10 and MITF. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 9081–9085.

Hsu, Y.-C., Li, L., and Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. Nat. Med. *20*, 847–856.

Huang, C.L., Nordlund, J.J., and Boissy, R. (2002). Vitiligo: a manifestation of apoptosis? Am. J. Clin. Dermatol. *3*, 301–308.

Huang, Y., Yi, X., Jian, Z., Wei, C., Li, S., Cai, C., Zhang, P., Li, K., Guo, S., Liu, L., et al. (2013). A single-nucleotide polymorphism of miR-196a-2 and vitiligo: an association

study and functional analysis in a Han Chinese population. Pigment Cell Melanoma Res.

Hussein, M.R. (2008). Extracutaneous malignant melanomas. Cancer Invest. *26*, 516–534.

Ignatius, M.S., Moose, H.E., El-Hodiri, H.M., and Henion, P.D. (2008). colgate/hdac1 Repression of foxd3 expression is required to permit mitfa-dependent melanogenesis. Dev. Biol. *313*, 568–583.

Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. Nature *389*, 966–970.

Imbert, A., Eelkema, R., Jordan, S., Feiner, H., and Cowin, P. (2001). Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. J. Cell Biol. *153*, 555–568.

Imokawa, G. (2004). Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *17*, 96–110.

Ines, D., Sonia, B., Riadh, B.M., Amel, E.G., Slaheddine, M., Hamida, T., Hamadi, A., and Basma, H. (2006). A comparative study of oxidant-antioxidant status in stable and active vitiligo patients. Arch. Dermatol. Res. *298*, 147–152.

Jaegle, M., Ghazvini, M., Mandemakers, W., Piirsoo, M., Driegen, S., Levavasseur, F., Raghoenath, S., Grosveld, F., and Meijer, D. (2003). The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. Genes Dev. *17*, 1380–1391.

Jain, A., Mal, J., Mehndiratta, V., Chander, R., and Patra, S.K. (2011). Study of oxidative stress in vitiligo. Indian J. Clin. Biochem. IJCB *26*, 78–81.

Jamal, S. (2000). Endothelin-1 down-regulates E-cadherin in melanocytic cells by apoptosis-independent activation of caspase-8. J. Am. Acad. Dermatol. *43*, 703–704.

Jang, Y.H., Kim, S.L., Lee, J.S., Kwon, K.-Y., Lee, S.-J., Kim, D.W., and Lee, W.J. (2014). Possible existence of melanocytes or melanoblasts in human sebaceous glands. Ann. Dermatol. *26*, 469–473.

Janssens, S., Van Den Broek, O., Davenport, I.R., Akkers, R.C., Liu, F., Veenstra, G.J.C., Hoppler, S., Vleminckx, K., and Destrée, O. (2013). The Wnt signaling mediator tcf1 is required for expression of foxd3 during Xenopus gastrulation. Int. J. Dev. Biol. *57*, 49–54.

Jansson, L., Kim, G.S., and Cheng, A.G. (2015). Making sense of Wnt signaling-linking hair cell regeneration to development. Front. Cell. Neurosci. *9*, 66.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 671–682.

Jessen, K.R., Brennan, A., Morgan, L., Mirsky, R., Kent, A., Hashimoto, Y., and Gavrilovic, J. (1994). The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. Neuron *12*, 509–527.

Jimbow, K., Chen, H., Park, J.S., and Thomas, P.D. (2001). Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. Br. J. Dermatol. *144*, 55–65.

Jin, E.J., Erickson, C.A., Takada, S., and Burrus, L.W. (2001). Wnt and BMP signaling

govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo. Dev. Biol. *233*, 22–37.

Jin, Y., Birlea, S.A., Fain, P.R., Gowan, K., Riccardi, S.L., Holland, P.J., Mailloux, C.M., Sufit, A.J.D., Hutton, S.M., Amadi-Myers, A., et al. (2010). Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. N. Engl. J. Med. *362*, 1686–1697.

Jin, Y., Birlea, S.A., Fain, P.R., Ferrara, T.M., Ben, S., Riccardi, S.L., Cole, J.B., Gowan, K., Holland, P.J., Bennett, D.C., et al. (2012). Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. Nat. Genet. *44*, 676–680.

Jordan, S.A., and Jackson, I.J. (2000a). MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. Dev. Biol. *225*, 424–436.

Jordan, S.A., and Jackson, I.J. (2000b). A late wave of melanoblast differentiation and rostrocaudal migration revealed in patch and rump-white embryos. Mech. Dev. *92*, 135–143.

Joseph, N.M., Mukouyama, Y.-S., Mosher, J.T., Jaegle, M., Crone, S.A., Dormand, E.-L., Lee, K.-F., Meijer, D., Anderson, D.J., and Morrison, S.J. (2004). Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. Dev. Camb. Engl. *131*, 5599–5612.

Jouneau, A., Yu, Y.Q., Pasdar, M., and Larue, L. (2000). Plasticity of cadherin-catenin expression in the melanocyte lineage. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *13*, 260–272.

Kaehler, K.C., Russo, P.A.J., Katenkamp, D., Kreusch, T., Neuber, K., Schwarz, T., and Hauschild, A. (2008). Melanocytic schwannoma of the cutaneous and subcutaneous tissues: three cases and a review of the literature. Melanoma Res. *18*, 438–442.

Kaplan, S., Odaci, E., Unal, B., Sahin, B., and Fornaro, M. (2009). Chapter 2: Development of the peripheral nerve. Int. Rev. Neurobiol. *87*, 9–26.

Kardash, E., Reichman-Fried, M., Maître, J.-L., Boldajipour, B., Papusheva, E., Messerschmidt, E.-M., Heisenberg, C.-P., and Raz, E. (2010). A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. Nat. Cell Biol. *12*, 47–53; sup pp 1–11.

Kawada, A. (2000). Risk and preventive factors for skin phototype. J. Dermatol. Sci. *23, Supplement 1*, S27–S29.

Kelsh, R.N. (2004). Genetics and evolution of pigment patterns in fish. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *17*, 326–336.

Kelsh, R.N., Harris, M.L., Colanesi, S., and Erickson, C.A. (2009). Stripes and belly-spots -- a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. Semin. Cell Dev. Biol. *20*, 90–104.

Kenney, J.A. (1971). Vitiligo treated by psoralens. A long-term follow-up study of the permanency of repigmentation. Arch. Dermatol. *103*, 475–480.

Van Keymeulen, A., Mascre, G., Youseff, K.K., Harel, I., Michaux, C., De Geest, N., Szpalski, C., Achouri, Y., Bloch, W., Hassan, B.A., et al. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. J. Cell

Biol. *187*, 91–100.

Kierszenbaum, A.L. (2006). Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique (De Boeck Supérieur).

Kim, N.-H., and Lee, A.-Y. (2010). Reduced aquaporin3 expression and survival of keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo. J. Invest. Dermatol. *130*, 2231–2239.

Kim, H., Won, S., Hwang, D.Y., Lee, J., Kim, M., Kim, R., Kim, W., Cha, B., Kim, T., Kim, D., et al. (2011). Downregulation of Wnt/β-catenin signaling causes degeneration of hippocampal neurons in vivo. Neurobiol. Aging *32*, 2316.e1–e15.

Kim, H.-J., Uhm, Y.K., Yun, J.Y., Im, S.H., Yim, S.-V., Chung, J.-H., Shin, M.-K., and Lee, M.-H. (2010). Association between polymorphisms of discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 (DDR1) and non-segmental vitiligo in the Korean population. Eur. J. Dermatol. EJD *20*, 231–232.

Kim, J., Lo, L., Dormand, E., and Anderson, D.J. (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. Neuron *38*, 17–31.

Kim, Y.S., Park, Y.L., Lee, J.S., and Whang, K.U. (2014). Multiple actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma occurred after PUVA therapy in a Korean patient. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. *30*, 277–279.

Kleer, C.G., van Golen, K.L., Braun, T., and Merajver, S.D. (2001). Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc *14*, 458–464.

Knecht, A.K., and Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. Nat. Rev. Genet. *3*, 453–461.

Köbner, H. (1876). Zur Aetiologie Ppsoriasis. Vjschr Dermatol 3: 559.

Kondo, T., and Hearing, V.J. (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. Expert Rev. Dermatol. *6*, 97–108.

Korobko, I.V. (2012). Review of current clinical studies of vitiligo treatments. Dermatol. Ther. *25 Suppl 1*, S17–S27.

Kos, R., Reedy, M.V., Johnson, R.L., and Erickson, C.A. (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. Dev. Camb. Engl. *128*, 1467–1479.

Krengel, S., Stark, I., Geuchen, C., Knoppe, B., Scheel, G., Schlenke, P., Gebert, A., Wünsch, L., Brinckmann, J., and Tronnier, M. (2005). Selective down-regulation of the alpha6-integrin subunit in melanocytes by UVB light. Exp. Dermatol. *14*, 411–419.

Krispin, S., Nitzan, E., Kassem, Y., and Kalcheim, C. (2010). Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. Dev. Camb. Engl. *137*, 585–595.

Krüger, C., and Schallreuter, K.U. (2012). A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. Int. J. Dermatol. *51*, 1206–1212.

Kunisada, T., Yoshida, H., Yamazaki, H., Miyamoto, A., Hemmi, H., Nishimura, E., Shultz, L.D., Nishikawa, S., and Hayashi, S. (1998). Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration

of melanocyte precursors. Dev. Camb. Engl. *125*, 2915–2923.

Kwinter, J., Pelletier, J., Khambalia, A., and Pope, E. (2007). High-potency steroid use in children with vitiligo: a retrospective study. J. Am. Acad. Dermatol. *56*, 236–241.

Laberge, G., Mailloux, C.M., Gowan, K., Holland, P., Bennett, D.C., Fain, P.R., and Spritz, R.A. (2005). Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *18*, 300–305.

Lacombe, M. (2006). Abrégé d'anatomie et de physiologie humaines (De Boeck).

Laddha, N.C., Dwivedi, M., Mansuri, M.S., Gani, A.R., Ansarullah, M., Ramachandran, A.V., Dalai, S., and Begum, R. (2013). Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. Exp. Dermatol. *22*, 245–250.

Lalueza-Fox, C., Römpler, H., Caramelli, D., Stäubert, C., Catalano, G., Hughes, D., Rohland, N., Pilli, E., Longo, L., Condemi, S., et al. (2007). A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. Science *318*, 1453–1455.

Lang, D., Lu, M.M., Huang, L., Engleka, K.A., Zhang, M., Chu, E.Y., Lipner, S., Skoultchi, A., Millar, S.E., and Epstein, J.A. (2005). Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. Nature *433*, 884–887.

Larribere, L., Wu, H., Novak, D., Galach, M., Bernhardt, M., Orouji, E., Weina, K., Knappe, N., Sachpekidis, C., Umansky, L., et al. (2015). NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model. Pigment Cell Melanoma Res.

Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 8263–8267.

Larue, L., Kumasaka, M., and Goding, C.R. (2003). Beta-catenin in the melanocyte lineage. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *16*, 312–317.

Lavoie, J.-F., Biernaskie, J.A., Chen, Y., Bagli, D., Alman, B., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2009). Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. Stem Cells Dev. *18*, 893–906.

Lazarova, R., Hristakieva, E., Lazarov, N., and Shani, J. (2000). Vitiligo-related neuropeptides in nerve fibers of the skin. Arch. Physiol. Biochem. *108*, 262–267.

Le, N., Nagarajan, R., Wang, J.Y.T., Araki, T., Schmidt, R.E., and Milbrandt, J. (2005). Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 2596–2601.

Lee, A.-Y. (2012). Role of keratinocytes in the development of vitiligo. Ann. Dermatol. *24*, 115–125.

Lee, H.-O., Levorse, J.M., and Shin, M.K. (2003). The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. Dev. Biol. *259*, 162–175.

Lee, H.-Y., Kléber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M.M., Kemler, R., and

Sommer, L. (2004). Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. Science *303*, 1020–1023.

Leone, D.P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., Macklin, W.B., Chambon, P., and Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. Mol. Cell. Neurosci. *22*, 430–440.

Lepe, V., Moncada, B., Castanedo-Cazares, J.P., Torres-Alvarez, M.B., Ortiz, C.A., and Torres-Rubalcava, A.B. (2003). A double-blind randomized trial of 0.1% tacrolimus vs 0.05% clobetasol for the treatment of childhood vitiligo. Arch. Dermatol. *139*, 581–585.

Lewallen, K.A., Shen, Y.-A.A., De la Torre, A.R., Ng, B.K., Meijer, D., and Chan, J.R. (2011). Assessing the role of the cadherin/catenin complex at the Schwann cell-axon interface and in the initiation of myelination. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 3032–3043.

Li, A., Ma, Y., Yu, X., Mort, R.L., Lindsay, C.R., Stevenson, D., Strathdee, D., Insall, R.H., Chernoff, J., Snapper, S.B., et al. (2011). Rac1 Drives Melanoblast Organization during Mouse Development by Orchestrating Pseudopod- Driven Motility and Cell-Cycle Progression. Dev. Cell *21*, 722–734.

Li, Z., Kim, S.H., Higgins, J.M., Brenner, M.B., and Sacks, D.B. (1999). IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. J. Biol. Chem. *274*, 37885–37892.

Lim, W.-S., Kim, C.-H., Kim, J.-Y., Do, B.-R., Kim, E.J., and Lee, A.-Y. (2014). Adipose-derived stem cells improve efficacy of melanocyte transplantation in animal skin. Biomol. Ther. *22*, 328–333.

Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature *445*, 843–850.

Lindsay, C.R., Lawn, S., Campbell, A.D., Faller, W.J., Rambow, F., Mort, R.L., Timpson, P., Li, A., Cammareri, P., Ridgway, R.A., et al. (2011). P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. Nat. Commun. *2*, 555.

Lister, J.A., Robertson, C.P., Lepage, T., Johnson, S.L., and Raible, D.W. (1999). nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. Dev. Camb. Engl. *126*, 3757–3767.

Lister, J.A., Cooper, C., Nguyen, K., Modrell, M., Grant, K., and Raible, D.W. (2006). Zebrafish Foxd3 is required for development of a subset of neural crest derivatives. Dev. Biol. *290*, 92–104.

Liu, P.Y., Bondesson, L., Löntz, W., and Johansson, O. (1996). The occurrence of cutaneous nerve endings and neuropeptides in vitiligo vulgaris: a case-control study. Arch. Dermatol. Res. *288*, 670–675.

Locher, H., Frijns, J.H.M., Huisman, M.A., and de Sousa Lopes, S.M.C. (2013a). TUBB3: Neuronal marker or melanocyte mimic? Cell Transplant.

Locher, H., de Rooij, K.E., de Groot, J.C.M.J., van Doorn, R., Gruis, N.A., Löwik, C.W.G.M., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Frijns, J.H.M., and Huisman, M.A. (2013b). Class III β-tubulin, a novel biomarker in the human melanocyte lineage. Differ. Res. Biol. Divers. *85*, 173–181.

Locher, H., Saadah, N., de Groot, S., de Groot, J.C.M.J., Frijns, J.H.M., and Huisman, M.A. (2015). Hair follicle bulge cultures yield class III β-tubulin-positive melanoglial cells. Histochem. Cell Biol.

Logan, D.W., Burn, S.F., and Jackson, I.J. (2006). Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *19*, 206–213.

Longo, K.A., Kennell, J.A., Ochocinska, M.J., Ross, S.E., Wright, W.S., and MacDougald, O.A. (2002). Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. J. Biol. Chem. *277*, 38239–38244.

Lu, C.P., Polak, L., Rocha, A.S., Pasolli, H.A., Chen, S.-C., Sharma, N., Blanpain, C., and Fuchs, E. (2012). Identification of stem cell populations in sweat glands and ducts reveals roles in homeostasis and wound repair. Cell *150*, 136–150.

Lu, L., Liu, L., Ji, Y., Jin, H., and He, L. (2014). Association of the 389 C/T polymorphism of the catalase gene with susceptibility to vitiligo: a meta-analysis. Clin. Exp. Dermatol. *39*, 454–460.

Luciani, F., Champeval, D., Herbette, A., Denat, L., Aylaj, B., Martinozzi, S., Ballotti, R., Kemler, R., Goding, C.R., De Vuyst, F., et al. (2011). Biological and mathematical modeling of melanocyte development. Dev. Camb. Engl. *138*, 3943–3954.

Luo, R., Gao, J., Wehrle-Haller, B., and Henion, P.D. (2003). Molecular identification of distinct neurogenic and melanogenic neural crest sublineages. Dev. Camb. Engl. *130*, 321–330.

Ma, Y., Li, A., Faller, W.J., Libertini, S., Fiorito, F., Gillespie, D.A., Sansom, O.J., Yamashiro, S., and Machesky, L.M. (2013). Fascin 1 is transiently expressed in mouse melanoblasts during development and promotes migration and proliferation. Dev. Camb. Engl. *140*, 2203–2211.

Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., and Jackson, I.J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. Dev. Biol. *192*, 99–107.

Maiese, K., Chong, Z.Z., Shang, Y.C., and Wang, S. (2012). Targeting disease through novel pathways of apoptosis and autophagy. Expert Opin. Ther. Targets *16*, 1203–1214.

Malissen, B., Tamoutounour, S., and Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. Nat. Rev. Immunol. *14*, 417–428.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., et al. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. EMBO J. *21*, 1948–1956.

Maresca, V., Roccella, M., Roccella, F., Camera, E., Del Porto, G., Passi, S., Grammatico, P., and Picardo, M. (1997). Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. J. Invest. Dermatol. *109*, 310–313.

Maro, G.S., Vermeren, M., Voiculescu, O., Melton, L., Cohen, J., Charnay, P., and Topilko, P. (2004). Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. Nat. Neurosci. *7*, 930–938.

Marrs, J.A., and Nelson, W.J. (1996). Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. Int. Rev. Cytol. *165*, 159–205.

Martinsen, B.J. (2005). Reference guide to the stages of chick heart embryology. Dev. Dyn. *233*, 1217–1237.

Matsuoka, T., Ahlberg, P.E., Kessaris, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W.D., McMahon, A.P., and Koentges, G. (2005). Neural crest origins of the neck and shoulder. Nature *436*, 347–355.

Mayoral, F.A., Vega, J.M., Stavisky, H., McCormick, C.L., and Parneix-Spake, A. (2007). Retrospective analysis of pimecrolimus cream 1% for treatment of facial vitiligo. J. Drugs Dermatol. JDD *6*, 517–521.

Mazereeuw-Hautier, J., Bezio, S., Mahe, E., Bodemer, C., Eschard, C., Viseux, V., Labreze, C., Plantin, P., Barbarot, S., Vabres, P., et al. (2010). Segmental and nonsegmental childhood vitiligo has distinct clinical characteristics: a prospective observational study. J. Am. Acad. Dermatol. *62*, 945–949.

McClatchey, A.I. (2007). Neurofibromatosis. Annu. Rev. Pathol. *2*, 191–216.

McKenzie, I.A., Biernaskie, J., Toma, J.G., Midha, R., and Miller, F.D. (2006). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 6651–6660.

Meffre, D., Massaad, C., and Grenier, J. (2015). Lithium chloride stimulates PLP and MBP expression in oligodendrocytes via Wnt/β-catenin and Akt/CREB pathways. Neuroscience *284*, 962–971.

Mezebish, D., Smith, K., Williams, J., Menon, P., Crittenden, J., and Skelton, H. (1998). Neurocristic cutaneous hamartoma: a distinctive dermal melanocytosis with an unknown malignant potential. Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc *11*, 573–578.

Michalski, J.-P., Anderson, C., Beauvais, A., De Repentigny, Y., and Kothary, R. (2011). The proteolipid protein promoter drives expression outside of the oligodendrocyte lineage during embryonic and early postnatal development. PloS One *6*, e19772.

Milet, C., Maczkowiak, F., Roche, D.D., and Monsoro-Burq, A.H. (2013). Pax3 and Zic1 drive induction and differentiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in Xenopus embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 5528–5533.

Mintz, B. (1967). Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *58*, 344–351.

Mirsky, R., Jessen, K.R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Parmantier, E., and Lawson, D. (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. J. Physiol. Paris *96*, 17–24.

Mofty, M. El, Mostafa, W., Esmat, S., Youssef, R., Azzam, O., Hunter, N., Hanafi, G. El, and Fawzi, M. (2006). Narrow band Ultraviolet B 311 nm in the treatment of vitiligo: two right-left comparison studies. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. *22*, 6–11.

Mofty, M. El, Bosseila, M., Mashaly, H.M., Gawdat, H., and Makaly, H. (2013). Broadband ultraviolet A vs. psoralen ultraviolet A in the treatment of vitiligo: a randomized controlled trial. Clin. Exp. Dermatol. *38*, 830–835.

El-Mofty, M., Mostafa, W., Youssef, R., El-Fangary, M., Elramly, A.Z., Mahgoub, D., and Fawzy, M. (2006). Ultraviolet A in vitiligo. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. *22*, 214–216.

Mohr, J. (1951). Vitiligo in a pair of monovular twins. Acta Genet. Stat. Med. *2*, 252–255.

Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., and Larue, L. (2001). IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. Oncogene *20*, 4942–4950.

Morrison, K.M., Miesegaes, G.R., Lumpkin, E.A., and Maricich, S.M. (2009). Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. Dev. Biol. *336*, 76–83.

Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C., and Anderson, D.J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. Cell *96*, 737–749.

Morrone, A., Picardo, M., de Luca, C., Terminali, O., Passi, S., and Ippolito, F. (1992). Catecholamines and vitiligo. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *5*, 65–69.

Mort, R.L., Hay, L., and Jackson, I.J. (2010). Ex vivo live imaging of melanoblast migration in embryonic mouse skin. Pigment Cell Melanoma Res. *23*, 299–301.

Mort, R.L., Keighren, M., Hay, L., and Jackson, I.J. (2014). Ex vivo Culture of Mouse Embryonic Skin and Live-imaging of Melanoblast Migration. J. Vis. Exp. JoVE.

Mort, R.L., Jackson, I.J., and Patton, E.E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. Development *142*, 620–632.

Mosher, D.B., Parrish, J.A., and Fitzpatrick, T.B. (1977). Monobenzylether of hydroquinone. A retrospective study of treatment of 18 vitiligo patients and a review of the literature. Br. J. Dermatol. *97*, 669–679.

Motohashi, T., and Kunisada, T. (2015). Extended multipotency of neural crest cells and neural crest-derived cells. Curr. Top. Dev. Biol. *111*, 69–95.

Motohashi, T., Kitagawa, D., Watanabe, N., Wakaoka, T., and Kunisada, T. (2013). Neural crest-derived cells sustain their multipotency even after entry into their target tissues. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.

Murisier, F., Guichard, S., and Beermann, F. (2007). The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *20*, 173–184.

Nakamura, M., Fukunaga-Kalabis, M., Yamaguchi, Y., Furuhashi, T., Nishida, E., Kato, H., Mizuno, T., Sugiura, M., and Morita, A. (2015). Site-specific migration of human fetal melanocytes in volar skin. J. Dermatol. Sci. *78*, 143–148.

Nakayama, A., Nguyen, M.T., Chen, C.C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C.A., and Arnheiter, H. (1998). Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. Mech. Dev. *70*, 155–166.

Namazi, M.R. (2007). Neurogenic dysregulation, oxidative stress, autoimmunity, and melanocytorrhagy in vitiligo: can they be interconnected? Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *20*, 360–363.

Nave, K.-A., and Schwab, M.H. (2005). Glial cells under remote control. Nat. Neurosci. *8*, 1420–1422.

Ndubaku, U., and de Bellard, M.E. (2008). Glial cells: old cells with new twists. Acta Histochem. *110*, 182–195.

Nejsum, L.N., and Nelson, W.J. (2007). A molecular mechanism directly linking E-cadherin adhesion to initiation of epithelial cell surface polarity. J. Cell Biol. *178*, 323–335.

Newman, M.D., and Silverberg, N.B. (2011). Once-daily application of calcipotriene 0.005%-betamethasone dipropionate 0.064% ointment for repigmentation of facial vitiligo. Cutis *88*, 256–259.

Nichols, D.H., and Weston, J.A. (1977). Melanogenesis in cultures of peripheral nervous tissue. I. The origin and prospective fate of cells giving rise to melanocytes. Dev. Biol. *60*, 217–225.

Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J. Invest. Dermatol. *127*, 2525–2532.

Niessen, C.M., Leckband, D., and Yap, A.S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. Physiol. Rev. *91*, 691–731.

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

Nishimura, E.K. (2011). Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. Pigment Cell Melanoma Res. *24*, 401–410.

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

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

Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. Science *307*, 720–724.

Nissan, M.H., Pratilas, C.A., Jones, A.M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A.J., Yao, Z., et al. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. Cancer Res. *74*, 2340–2350.

Nitzan, E., Krispin, S., Pfaltzgraff, E.R., Klar, A., Labosky, P.A., and Kalcheim, C. (2013a). A dynamic code of dorsal neural tube genes regulates the segregation between neurogenic and melanogenic neural crest cells. Dev. Camb. Engl.

Nitzan, E., Pfaltzgraff, E.R., Labosky, P.A., and Kalcheim, C. (2013b). Neural crest and Schwann cell progenitor-derived melanocytes are two spatially segregated populations similarly regulated by Foxd3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 12709–12714.

Niwa, T., Mochii, M., Nakamura, A., and Shiojiri, N. (2002). Plumage pigmentation and expression of its regulatory genes during quail development--histochemical analysis

using Bh (black at hatch) mutants. Mech. Dev. *118*, 139–146.

Njoo, M.D., Vodegel, R.M., and Westerhof, W. (2000). Depigmentation therapy in vitiligo universalis with topical 4-methoxyphenol and the Q-switched ruby laser. J. Am. Acad. Dermatol. *42*, 760–769.

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

Okamoto, N., Aoto, T., Uhara, H., Yamazaki, S., Akutsu, H., Umezawa, A., Nakauchi, H., Miyachi, Y., Saida, T., and Nishimura, E.K. (2014). A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. Pigment Cell Melanoma Res. *27*, 1039–1050.

Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J., and Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. Dev. Camb. Engl. *124*, 2377–2386.

Opdecamp, K., Kos, L., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (1998). Endothelin signalling in the development of neural crest-derived melanocytes. Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell. *76*, 1093–1099.

Ortega, M.C., Bribián, A., Peregrín, S., Gil, M.T., Marín, O., and de Castro, F. (2012). Neuregulin-1/ErbB4 signaling controls the migration of oligodendrocyte precursor cells during development. Exp. Neurol. *235*, 610–620.

Ortonne, J., and Benedetto, J. (1981). Mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires. Ann. Génétique Sélection Anim. *13*, 17–26.

Ortonne, J.P., MacDonald, D.M., Micoud, A., and Thivolet, J. (1979). PUVA-induced repigmentation of vitiligo: a histochemical (split-DOPA) and ultrastructural study. Br. J. Dermatol. *101*, 1–12.

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

Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2000). Autoimmunity and the immunotherapy of cancer: targeting the “self” to destroy the “other.” Crit. Rev. Immunol. *20*, 433–450.

Owens, D.W., McLean, G.W., Wyke, A.W., Paraskeva, C., Parkinson, E.K., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2000). The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. Mol. Biol. Cell *11*, 51–64.

Papkoff, J., and Schryver, B. (1990). Secreted int-1 protein is associated with the cell surface. Mol. Cell. Biol. *10*, 2723–2730.

Park, H.S., Lee, Y.S., and Chun, D.K. (2003). Squamous cell carcinoma in vitiligo lesion after long-term PUVA therapy. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *17*, 578–580.

Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S.S., Chakrabarti, L., McMahon, A.P., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1999). Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. Neuron *23*, 713–724.

Parsad, D., Saini, R., and Nagpal, R. (1999). Calcipotriol in vitiligo: a preliminary study. Pediatr. Dermatol. *16*, 317–320.

Passi, S., Grandinetti, M., Maggio, F., Stancato, A., and De Luca, C. (1998). Epidermal oxidative stress in vitiligo. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *11*, 81–85.

Pavan, W.J., and Raible, D.W. (2012). Specification of neural crest into sensory neuron and melanocyte lineages. Dev. Biol. *366*, 55–63.

Pegoraro, C., and Monsoro-Burq, A.H. (2013). Signaling and transcriptional regulation in neural crest specification and migration: lessons from xenopus embryos. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *2*, 247–259.

Pelle, E., Mammone, T., Maes, D., and Frenkel, K. (2005). Keratinocytes Act as a Source of Reactive Oxygen Species by Transferring Hydrogen Peroxide to Melanocytes. J. Invest. Dermatol. *124*, 793–797.

Pereira, J.A., Lebrun-Julien, F., and Suter, U. (2012). Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. Trends Neurosci. *35*, 123–134.

Perlin, J.R., Lush, M.E., Stephens, W.Z., Piotrowski, T., and Talbot, W.S. (2011). Neuronal Neuregulin 1 type III directs Schwann cell migration. Development *138*, 4639–4648.

Picardo, M., and Bastonini, E. (2015). A New View of Vitiligo: Looking at Normal-Appearing Skin. J. Invest. Dermatol. *135*, 1713–1714.

Pichler, R., Sfetsos, K., Badics, B., Gutenbrunner, S., Berg, J., and Auböck, J. (2009). Lymphocyte imbalance in vitiligo patients indicated by elevated CD4+/CD8+ T-cell ratio. Wien. Med. Wochenschr. 1946 *159*, 337–341.

Piliang, M.P. (2011). Acral lentiginous melanoma. Clin. Lab. Med. *31*, 281–288.

Pinon, P., and Wehrle-Haller, B. (2011). Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation. Pigment Cell Melanoma Res. *24*, 282–294.

Pla, P., Moore, R., Morali, O.G., Grille, S., Martinozzi, S., Delmas, V., and Larue, L. (2001). Cadherins in neural crest cell development and transformation. J. Cell. Physiol. *189*, 121–132.

Pla, P., Alberti, C., Solov'eva, O., Pasdar, M., Kunisada, T., and Larue, L. (2005). Ednrb2 orients cell migration towards the dorsolateral neural crest pathway and promotes melanocyte differentiation. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *18*, 181–187.

Plonka, P.M., Passeron, T., Brenner, M., Tobin, D.J., Shibahara, S., Thomas, A., Slominski, A., Kadekaro, A.L., Hershkovitz, D., Peters, E., et al. (2009). What are melanocytes really doing all day long...? Exp. Dermatol. *18*, 799–819.

Plouhinec, J.-L., Roche, D.D., Pegoraro, C., Figueiredo, A.L., Maczkowiak, F., Brunet, L.J., Milet, C., Vert, J.-P., Pollet, N., Harland, R.M., et al. (2014). Pax3 and Zic1 trigger the early neural crest gene regulatory network by the direct activation of multiple key neural crest specifiers. Dev. Biol. *386*, 461–472.

Pohl, B.S., and Knöchel, W. (2001). Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in Xenopus embryos. Mech. Dev. *103*, 93–106.

Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Dutrieux, R.P., and Das, P.K. (1993). Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. J. Invest. Dermatol. *100*, 816–822.

Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Smit, N.P., Oosting, J., Westerhof, W., and Pavel, S. (1994). Catechol-O-methyltransferase in vitiligo. Arch. Dermatol. Res. *286*, 81–86.

Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., and Das, P.K. (1997). Tenascin is overexpressed in vitiligo lesional skin and inhibits melanocyte adhesion. Br. J. Dermatol. *137*, 171–178.

Le Poole, I.C., Wañkowicz-Kalińska, A., van den Wijngaard, R.M.J.G.J., Nickoloff, B.J., and Das, P.K. (2004). Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res. *9*, 68–72.

Potterf, S.B., Furumura, M., Dunn, K.J., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2000). Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. Hum. Genet. *107*, 1–6.

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.

Prasad, P.V.V., and Bhatnagar, V.K. (2003). Medico-historical study of "Kilasa" (vitiligo/leucoderma) a common skin disorder. Bull. Indian Inst. Hist. Med. Hyderabad *33*, 113–127.

Puig, I., Yajima, I., Bonaventure, J., Delmas, V., and Larue, L. (2009). The tyrosinase promoter is active in a subset of vagal neural crest cells during early development in mice. Pigment Cell Melanoma Res. *22*, 331–334.

Van Raamsdonk, C.D., and Deo, M. (2013). Links between Schwann cells and melanocytes in development and disease. Pigment Cell Melanoma Res. *26*, 634–645.

Ramien, M.L., Ondrejchak, S., Gendron, R., Hatami, A., McCuaig, C.C., Powell, J., and Marcoux, D. (2014). Quality of life in pediatric patients before and after cosmetic camouflage of visible skin conditions. J. Am. Acad. Dermatol. *71*, 935–940.

Rao, R.K., Basuroy, S., Rao, V.U., Karnaky Jr, K.J., and Gupta, A. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. Biochem. J. *368*, 471–481.

Rawles, M.E. (1947). Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. Physiol. Zool. *20*, 248–266.

Ricard, A.S., Pain, C., Daubos, A., Ezzedine, K., Lamrissi-Garcia, I., Bibeyran, A., Guyonnet-Dupérat, V., Taieb, A., and Cario-André, M. (2012). Study of CCN3 (NOV) and DDR1 in normal melanocytes and vitiligo skin. Exp. Dermatol. *21*, 411–416.

Rittié, L., Perbal, B., Castellot, J.J., Orringer, J.S., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2011). Spatial-temporal modulation of CCN proteins during wound healing in human skin in vivo. J. Cell Commun. Signal. *5*, 69–80.

Rizvi, T.A., Huang, Y., Sidani, A., Atit, R., Largaespada, D.A., Boissy, R.E., and Ratner, N. (2002). A novel cytokine pathway suppresses glial cell melanogenesis after injury to adult nerve. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 9831–9840.

Rodriguez, F.J., Lewis-Tuffin, L.J., and Anastasiadis, P.Z. (2012a). E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. Biochim. Biophys. Acta *1826*, 23–31.

Rodriguez, F.J., Folpe, A.L., Giannini, C., and Perry, A. (2012b). Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. Acta Neuropathol. (Berl.) *123*, 295–319.

Romagnolo, B., Berrebi, D., Saadi-Keddoucci, S., Porteu, A., Pichard, A.L., Peuchmaur, M., Vandewalle, A., Kahn, A., and Perret, C. (1999). Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin. Cancer Res. *59*, 3875–3879.

Rouzaud, F., Costin, G.-E., Yamaguchi, Y., Valencia, J.C., Berens, W.F., Chen, K.G., Hoashi, T., Böhm, M., Abdel-Malek, Z.A., and Hearing, V.J. (2006). Regulation of constitutive and UVR-induced skin pigmentation by melanocortin 1 receptor isoforms. FASEB J. *20*, 1927–1929.

Ruiz-Argüelles, A., Brito, G.J., Reyes-Izquierdo, P., Pérez-Romano, B., and Sánchez-Sosa, S. (2007). Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. J. Autoimmun. *29*, 281–286.

Saldana-Caboverde, A., Perera, E.M., Watkins-Chow, D., Hansen, N.F., Vemulapalli, M., Mullikin, J.C., Nisc Comparative Sequencing Program, null, Pavan, W.J., and Kos, L. (2015). The transcription factors Ets1 and Sox10 interact during murine melanocyte development. Dev. Biol.

Samatar, A.A., and Poulikakos, P.I. (2014). Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. Nat. Rev. Drug Discov. *13*, 928–942.

Sandell, L.L., and Trainor, P.A. (2006). Neural crest cell plasticity. size matters. Adv. Exp. Med. Biol. *589*, 78–95.

Sandoval-Cruz, M., García-Carrasco, M., Sánchez-Porras, R., Mendoza-Pinto, C., Jiménez-Hernández, M., Munguía-Realpozo, P., and Ruiz-Argüelles, A. (2011). Immunopathogenesis of vitiligo. Autoimmun. Rev. *10*, 762–765.

Sangiovanni, G. (1819). Descrizione di un particolare sistema di organi cromoforo espansivo-dermoideo e dei fenomeni che esso produce, scoperto nei molluschi cefaloso. G Encicl. Napoli 1–13.

De Santis, G., Miotti, S., Mazzi, M., Canevari, S., and Tomassetti, A. (2009). E-cadherin directly contributes to PI3K/AKT activation by engaging the PI3K-p85 regulatory subunit to adherens junctions of ovarian carcinoma cells. Oncogene *28*, 1206–1217.

Schallreuter, K.U., Lemke, R., Brandt, O., Schwartz, R., Westhofen, M., Montz, R., and Berger, J. (1994a). Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. Dermatol. Basel Switz. *188*, 269–275.

Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Ziegler, I., Lemke, K.R., Pittelkow, M.R., Lindsey, N.J., and Gütlich, M. (1994b). Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. Biochim. Biophys. Acta *1226*, 181–192.

Schallreuter, K.U., Büttner, G., Pittelkow, M.R., Wood, J.M., Swanson, N.N., and Körner, C. (1994c). Cytotoxicity of 6-biopterin to human melanocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *204*, 43–48.

Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Pittelkow, M.R., Buttner, G., Swanson, N., Korner, C., and Ehrke, C. (1996). Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients

with vitiligo. Arch. Dermatol. Res. *288*, 14–18.

Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M., Beazley, W.D., Gaze, D.C., Tobin, D.J., Marshall, H.S., Panske, A., Panzig, E., and Hibberts, N.A. (1999). In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H2O2) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res. *4*, 91–96.

Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M., Beazley, W.D., Peters, E.M., Marles, L.K., Behrens-Williams, S.C., Dummer, R., Blau, N., and Thöny, B. (2001). Epidermal H(2)O(2) accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH4) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH4-dependent processes? J. Invest. Dermatol. *116*, 167–174.

Schallreuter, K.U., Gibbons, N.C.J., Zothner, C., Abou Elloof, M.M., and Wood, J.M. (2007). Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress disrupts calcium binding on calmodulin: more evidence for oxidative stress in vitiligo. Biochem. Biophys. Res. Commun. *360*, 70–75.

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

Schallreuter, K.U., Bahadoran, P., Picardo, M., Slominski, A., Elassiuty, Y.E., Kemp, E.H., Giachino, C., Liu, J.B., Luiten, R.M., Lambe, T., et al. (2008b). Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? Exp. Dermatol. *17*, 139–140; discussion 141–160.

De Schepper, S., Boucneau, J., Lambert, J., Messiaen, L., and Naeyaert, J.-M. (2005). Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an overview. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *18*, 13–24.

De Schepper, S., Maertens, O., Callens, T., Naeyaert, J.-M., Lambert, J., and Messiaen, L. (2008). Somatic mutation analysis in NF1 café au lait spots reveals two NF1 hits in the melanocytes. J. Invest. Dermatol. *128*, 1050–1053.

Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G.J., Goodall, J., Hallsson, J.H., Goding, C.R., Steingrimsson, E., and Hecht, A. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. Mol. Cell. Biol. *26*, 8914–8927.

Schwartz, D.R., Wu, R., Kardia, S.L.R., Levin, A.M., Huang, C.-C., Shedden, K.A., Kuick, R., Misek, D.E., Hanash, S.M., Taylor, J.M.G., et al. (2003). Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. Cancer Res. *63*, 2913–2922.

Seirafi, H., Farnaghi, F., Firooz, A., Vasheghani-Farahani, A., Alirezaie, N.-S., and Dowlati, Y. (2007). Pimecrolimus cream in repigmentation of vitiligo. Dermatol. Basel Switz. *214*, 253–259.

Serbedzija, G.N., Fraser, S.E., and Bronner-Fraser, M. (1990). Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. Dev. Camb. Engl. *108*, 605–612.

Shamir, E.R., and Ewald, A.J. (2015). Adhesion in mammary development: novel roles for E-

cadherin in individual and collective cell migration. Curr. Top. Dev. Biol. *112*, 353–382.

Shane, G.P. Du (1934). The source of pigment cells in Amphibia. Science 620–621.

Sheean, M.E., McShane, E., Cheret, C., Walcher, J., Müller, T., Wulf-Goldenberg, A., Hoelper, S., Garratt, A.N., Krüger, M., Rajewsky, K., et al. (2014). Activation of MAPK overrides the termination of myelin growth and replaces Nrg1/ErbB3 signals during Schwann cell development and myelination. Genes Dev. *28*, 290–303.

Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 683–690.

Shin, M.K., Levorse, J.M., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. Nature *402*, 496–501.

Sieber-Blum, M., Schnell, L., Grim, M., Hu, Y.F., Schneider, R., and Schwab, M.E. (2006). Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. Mol. Cell. Neurosci. *32*, 67–81.

Silva de Castro, C.C., do Nascimento, L.M., Walker, G., Werneck, R.I., Nogoceke, E., and Mira, M.T. (2010). Genetic variants of the DDR1 gene are associated with vitiligo in two independent Brazilian population samples. J. Invest. Dermatol. *130*, 1813–1818.

Silverberg, N.B., Lin, P., Travis, L., Farley-Li, J., Mancini, A.J., Wagner, A.M., Chamlin, S.L., and Paller, A.S. (2004). Tacrolimus ointment promotes repigmentation of vitiligo in children: a review of 57 cases. J. Am. Acad. Dermatol. *51*, 760–766.

Silvers, W.K. (1979). The Coat Colors of Mice: A Model for Mammalian Gene Action and Interaction (New York, NY: Springer).

Simões-Costa, M.S., McKeown, S.J., Tan-Cabugao, J., Sauka-Spengler, T., and Bronner, M.E. (2012). Dynamic and differential regulation of stem cell factor FoxD3 in the neural crest is Encrypted in the genome. PLoS Genet. *8*, e1003142.

Simon, C., Lickert, H., Götz, M., and Dimou, L. (2012). Sox10-iCreERT2 : a mouse line to inducibly trace the neural crest and oligodendrocyte lineage. Genes. N. Y. N 2000 *50*, 506–515.

Soliman, M., Samy, N.A., Abo Eittah, M., and Hegazy, M. (2015). Comparative Study between Excimer Light and Topical Antioxidant versus Excimer Light alone for treatment of Vitiligo. J. Cosmet. Laser Ther. Off. Publ. Eur. Soc. Laser Dermatol. 1–18.

Southard-Smith, E.M., Kos, L., and Pavan, W.J. (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. Nat. Genet. *18*, 60–64.

Spritz, R.A. (2008). The genetics of generalized vitiligo. Curr. Dir. Autoimmun. *10*, 244–257.

Spritz, R.A. (2013). Modern vitiligo genetics sheds new light on an ancient disease. J. Dermatol. *40*, 310–318.

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. BMC Dev. Biol. *1*, 4.

Steingrímsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. Annu. Rev. Genet. *38*, 365–411.

Stocker, K.M., Baizer, L., Coston, T., Sherman, L., and Ciment, G. (1995). Regulated expression of neurofibromin in migrating neural crest cells of avian embryos. J. Neurobiol. *27*, 535–552.

Suzuki, I., Cone, R.D., Im, S., Nordlund, J., and Abdel-Malek, Z.A. (1996). Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. Endocrinology *137*, 1627–1633.

Szabo, G. (1967). The regional anatomy of the human integument with special reference to the distribution of hair follicles, sweat glands, and melanocytes. Philos Trans R Soc Lond B 447–485.

Tadeu, A.M.B., and Horsley, V. (2014). Epithelial stem cells in adult skin. Curr. Top. Dev. Biol. *107*, 109–131.

Taïeb, A., and Picardo, M. (2009). Clinical practice. Vitiligo. N. Engl. J. Med. *360*, 160–169.

Taïeb, A., Picardo, M., and VETF Members (2007). The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *20*, 27–35.

Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2000). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. J. Biol. Chem. *275*, 14013–14016.

Tang, A., Eller, M.S., Hara, M., Yaar, M., Hirohashi, S., and Gilchrest, B.A. (1994). E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. J. Cell Sci. *107 (Pt 4)*, 983–992.

Tarafder, A.K., Bolasco, G., Correia, M.S., Pereira, F.J.C., Iannone, L., Hume, A.N., Kirkpatrick, N., Picardo, M., Torrisi, M.R., Rodrigues, I.P., et al. (2014). Rab11b mediates melanin transfer between donor melanocytes and acceptor keratinocytes via coupled exo/endocytosis. J. Invest. Dermatol. *134*, 1056–1066.

Tarlé, R.G., Silva de Castro, C.C., do Nascimento, L.M., and Mira, M.T. (2015). Polymorphism of the E-cadherin gene CDH1 is associated with susceptibility to vitiligo. Exp. Dermatol.

Tawk, M., Makoukji, J., Belle, M., Fonte, C., Trousson, A., Hawkins, T., Li, H., Ghandour, S., Schumacher, M., and Massaad, C. (2011). Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 3729–3742.

Tay, S.S., Roediger, B., Tong, P.L., Tikoo, S., and Weninger, W. (2014). The Skin-Resident Immune Network. Curr. Dermatol. Rep. *3*, 13–22.

Teng, L., Mundell, N.A., Frist, A.Y., Wang, Q., and Labosky, P.A. (2008). Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. Dev. Camb. Engl. *135*, 1615–1624.

Theveneau, E., and Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. Dev. Biol. *366*, 34–54.

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.

Tinkle, C.L., Pasolli, H.A., Stokes, N., and Fuchs, E. (2008). New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 15405–15410.

Tobin, D.J., Swanson, N.N., Pittelkow, M.R., Peters, E.M., and Schallreuter, K.U. (2000). Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. J. Pathol. *191*, 407–416.

Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat. Cell Biol. *3*, 778–784.

Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D., and Miller, F.D. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. Stem Cells Dayt. Ohio *23*, 727–737.

Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. Nature *371*, 796–799.

Tosh, D., and Slack, J.M.W. (2002). How cells change their phenotype. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *3*, 187–194.

Toyoda, M., Luo, Y., Makino, T., Matsui, C., and Morohashi, M. (1999). Calcitonin gene-related peptide upregulates melanogenesis and enhances melanocyte dendricity via induction of keratinocyte-derived melanotrophic factors. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res. *4*, 116–125.

Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science *303*, 359–363.

Tunggal, J.A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Günzel, D., Fromm, M., Kemler, R., Krieg, T., and Niessen, C.M. (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. EMBO J. *24*, 1146–1156.

Voiculescu, O., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S. (2000). Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. Genes. N. Y. N 2000 *26*, 123–126.

Wagner, R.Y., Luciani, F., Cario-André, M., Rubod, A., Petit, V., Benzekri, L., Ezzedine, K., Lepreux, S., Steingrimsson, E., Taieb, A., et al. (2015). Altered E-Cadherin Levels and Distribution in Melanocytes Precede Clinical Manifestations of Vitiligo. J. Invest. Dermatol.

Wahlbuhl, M., Reiprich, S., Vogl, M.R., Bösl, M.R., and Wegner, M. (2012). Transcription factor Sox10 orchestrates activity of a neural crest-specific enhancer in the vicinity of its gene. Nucleic Acids Res. *40*, 88–101.

Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., and Mitchell, A.L. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science *249*, 181–186.

Wan, P., Hu, Y., and He, L. (2011). Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. Mol. Cell. Biochem. *354*, 241–246.

Wanner, I.B., Guerra, N.K., Mahoney, J., Kumar, A., Wood, P.M., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2006). Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves. Glia *54*, 439–459.

Wasmeier, C., Hume, A.N., Bolasco, G., and Seabra, M.C. (2008). Melanosomes at a glance. J. Cell Sci. *121*, 3995–3999.

Wehrle-Haller, B. (2003). The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *16*, 287–296.

Wehrle-Haller, B., Meller, M., and Weston, J.A. (2001). Analysis of melanocyte precursors in Nfl mutants reveals that MGF/KIT signaling promotes directed cell migration independent of its function in cell survival. Dev. Biol. *232*, 471–483.

Weiss, G., Shemer, A., and Trau, H. (2002). The Koebner phenomenon: review of the literature. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV *16*, 241–248.

Westerhof, W. (2006). The discovery of the human melanocyte. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *19*, 183–193.

Westerhof, W., and d'Ischia, M. (2007). Vitiligo puzzle: the pieces fall in place. Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *20*, 345–359.

Whiteman, D.C., Parsons, P.G., and Green, A.C. (1999). Determinants of melanocyte density in adult human skin. Arch. Dermatol. Res. *291*, 511–516.

Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Price, E.R., Cui, J., Lessnick, S.L., Wu, M., He, X., and Fisher, D.E. (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. J. Cell Biol. *158*, 1079–1087.

van den Wijngaard, R., Wankowicz-Kalinska, A., Le Poole, C., Tigges, B., Westerhof, W., and Das, P. (2000). Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *80*, 1299–1309.

Wildfang, I.L., Jacobsen, F.K., and Thestrup-Pedersen, K. (1992). PUVA treatment of vitiligo: a retrospective study of 59 patients. Acta Derm. Venereol. *72*, 305–306.

Wilkie, A.L., Jordan, S.A., and Jackson, I.J. (2002). Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. Dev. Camb. Engl. *129*, 3349–3357.

Woodhoo, A., and Sommer, L. (2008). Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. Glia *56*, 1481–1490.

Wu, J., Saint-Jeannet, J.-P., and Klein, P.S. (2003). Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. Trends Neurosci. *26*, 40–45.

Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev. *14*, 301–312.

Yaghoobi, R., Omidian, M., and Bagherani, N. (2011). Vitiligo: a review of the published work. J. Dermatol. *38*, 419–431.

Yajima, I., Belloir, E., Bourgeois, Y., Kumasaka, M., Delmas, V., and Larue, L. (2006). Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. Genes. N. Y. N 2000 *44*, 34–43.

Yajima, I., Colombo, S., Puig, I., Champeval, D., Kumasaka, M., Belloir, E., Bonaventure, J., Mark, M., Yamamoto, H., Taketo, M.M., et al. (2013). A subpopulation of smooth muscle cells, derived from melanocyte-competent precursors, prevents patent ductus arteriosus. PloS One *8*, e53183.

Yamaguchi, Y., and Hearing, V.J. (2014). Melanocytes and their diseases. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *4*.

Yamaguchi, Y., Itami, S., Watabe, H., Yasumoto, K.-I., Abdel-Malek, Z.A., Kubo, T., Rouzaud, F., Tanemura, A., Yoshikawa, K., and Hearing, V.J. (2004). Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. J. Cell Biol. *165*, 275–285.

Yamaguchi, Y., Passeron, T., Hoashi, T., Watabe, H., Rouzaud, F., Yasumoto, K., Hara, T., Tohyama, C., Katayama, I., Miki, T., et al. (2008). Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *22*, 1009–1020.

Yang, J., Wang, J., Pan, L., Li, H., Rao, C., Zhang, X., Niu, G., Qu, J., and Hou, L. (2014). BMP4 is required for the initial expression of MITF in melanocyte precursor differentiation from embryonic stem cells. Exp. Cell Res. *320*, 54–61.

Yao, L., Hu, D.-N., Chen, M., and Li, S.-S. (2012). Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced expression of interleukin-6 by epidermal melanocytes. Arch. Dermatol. Res.

Yohn, J.J., Norris, D.A., Yrastorza, D.G., Buno, I.J., Leff, J.A., Hake, S.S., and Repine, J.E. (1991). Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. J. Invest. Dermatol. *97*, 405–409.

Young, P., Boussadia, O., Halfter, H., Grose, R., Berger, P., Leone, D.P., Robenek, H., Charnay, P., Kemler, R., and Suter, U. (2003). E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. EMBO J. *22*, 5723–5733.

Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N., and Gessler, M. (2006). Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. Genes. Chromosomes Cancer *45*, 565–574.

ANNEXE

ANNEXE 1 : Modèles murins de référence

Modèle murin	Fonction	Cellules cibles	Timing d'expression troncal	Construction	Référence
Recombinase Cre					
Sox10::Cre	recombinase	CCN migratoires et leurs dérivés	CCN émergeant du TN	transgène possédant le promoteur de Sox10 suivi du gène de la recombinase Cre	Matsuoka et al. 2005
Wnt1::Cre	recombinase	CCN pré-migratoires et leurs dérivés	CCN du tube neural	transgène possédant l'activateur de *Wnt1* suivi du gène de la recombinase Cre	Daniellan et al. 1998
Tyr::Cre	recombinase	mélanoblastes, cellules GFAP+ (cellule de Schwann immature), SCP?	à partir de E10.5	transgène possédant le promoteur de la tyrosinase suivi du gène de la recombinase Cre	Delmas et al. 2003
Dhh::Cre	recombinase	SCP, cellules de Schwann du PNS, cellules de Sertoli	à partir de E12	transgène possédant les séquences régulatrices de *Dhh* suivi du gène de la recombinase Cre	Jaegle et al. 2003
PLP::Cre	recombinase	cellules de Schwann, oligodendrocytes, mélanoblastes de la seconde vague, (neurones?)	à partir de E11.5	transgène possédant le promoteur de *Plp1* suivi du gène de la recombinase Cre	Leone et al. 2003
Krox20::Cre	recombinase	cellule de Schwann pro-myélinisantes	à partir de E16	transgène possédant le promoteur de *Krox20* suivi du gène de la recombinase Cre	Voiculescu et al. 2000
Mitf::Cre	recombinase	mélanoblastes	à partir de E11.5	transgène possédant le promoteur de *M-Mitf* suivi du gène de la recombinase Cre	Alizadeh et al. 2008
Recombinase Cre inductible					
Tyr::CreERT2	recombinase inductible par tamoxifène	mélanoblastes, SCP et ses dérivés?	J+1 après injection tamoxifène	transgène CreERT2 avec le promoteur et l'activateur de la tyrosinase	Yajima et al. 2006 Bosenberg et al. 2006
PLP::CreERT2	recombinase inductible par tamoxifène	SCP, neurones, mélanoblastes de la seconde vague		transgène CreERT2 avec le promoteur de *Plp1*	Leone et al. 2003
Sox10::CreERT2	recombinase inductible par tamoxifène	CCN migratoires et leurs dérivés		transgène CreERT2 avec le promoteur de *Sox10*	Simon et al. 2012
Wnt1::CreERT2	recombinase inductible par tamoxifène	CCN pré-migratoires et leurs dérivés		transgène CreERT2 avec le promoteur de *Wnt1*	Baggiolini et al. 2015
Suivi du lignage					
Z/EG	expression de la GFP après recombinaison	selon Cre	selon Cre	transgène GFP précédé d'une cassette stop floxée au locus Rosa26	Novak et al. 2000
Rosa26-YFP	expression de la YFP après recombinaison			transgène YFP précédé d'une cassette stop floxée au locus Rosa26	Srinivas 2001
Autres modèles					
Dct::LacZ	expression de beta-galactosidase dans cellules DCT+	mélanoblastes	à partir de E10.5	cassette beta-galactosidase avec un promoteur Dct	Mackenzie et al. 1997
bcatΔex3F/F	stabilisation de la protéine	selon Cre	selon Cre	exon 3 du gène *beta-caténine* endogène floxé	Harada et al. 1999
EcadF/F	pas de production de protéine	selon Cre	selon Cre	exon 6 à 10 du gène *Cdh1* endogène floxé	Boussadia et al. 2002
Δbcat	pas de production de protéine	selon Cre	selon Cre	exon 2 à 6 du gène *beta-caténine* endogène floxé	Brault et al. 2001
bcat^{ex}	expression d'une forme mutée de beta-caténine	dans les mélanoblastes et les cellules tyrosinases +	-	transgène possédant le promoteur et l'activateur de la tyrosinase suivi d' un gène muté de *beta-caténine*	Delmas et al. 2007
patch	mis-expression de Kit dans le derme et le dermatome	mélanocytes, mastocytes	-	deletion d'une partie du promoteur du gène *Kit* en 5'	Dunttlinger 1995
rump-white	mis-expression de Kit dans le derme et le dermatome	mélanocytes, mastocytes	-	inversion d'une partie du gène *Kit*	Bucan 1995
Mitf vga9	production d'un ARNm tronqué et pas de proteine	mélanoblastes et cellules MITF +	-	insertion de 50 copies d'un transgène dans le gène *Mitf*	Hodgkinson 1993

Annexe 1 : Caractéristiques des principaux modèles murins mentionnés.