

Les cellules souches des mélanocytes de l'adulte

Geneviève Aubin-Houzelstein^{1,2}, Johanna Djian-Zaouche^{1,2} et Jean-Jacques Panthier^{1,2}

Unité de Génétique fonctionnelle de la Souris, URA CNRS 2578, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris cedex ; 2. UMR955 INRA ENVA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex, France

Auteurs correspondants : Geneviève Aubin-Houzelstein, ghouzelstein@vet-alfort.fr,
Jean-Jacques Panthier, panthier@pasteur.fr

Reçu le 21 Novembre 2007

Résumé – Les cellules souches des mélanocytes ont été récemment localisées dans le follicule pileux de la souris, dans un épaissement de la gaine épithéliale externe à la base de la partie permanente du follicule. La déplétion de la population des cellules souches et des progéniteurs des mélanocytes est responsable chez les individus âgés du grisonnement naturel des poils de la souris et des cheveux de l'homme. Les cellules souches des mélanocytes semblent être à l'origine de mélanomes malins cutanés. Quelques mutations spontanées ou fabriquées à façon accélèrent le processus de grisonnement avec l'âge. Ces mutations ont permis d'identifier des gènes et des voies de signalisation gouvernant l'établissement, le maintien et/ou la différenciation des cellules souches des mélanocytes. Dans cette revue, nous essayons de résumer les résultats récents sur les cellules souches des mélanocytes et définissons quelques questions importantes dans le domaine.

Mots clés : Pigmentation / souris / mélanome / Notch / Régénération / Niche / Cellule souche

Abstract – Melanocyte stem cells in adults.

Melanocyte stem cells have been recently localized in mice, in the outer root sheath of the lower permanent portion of the hair follicle. Specific depletion of melanocyte stem cell population is responsible for natural hair greying in aging mice and humans. Melanocyte stem cells also seem to drive the growth of malignant melanomas. A few mutations, either spontaneous or genetically engineered, accelerate the natural process of hair greying with age. These mutations allowed the identification of genes and signalling pathways controlling emergence, maintenance and/or differentiation of melanocyte stem cells. This review summarizes recent studies on the melanocyte stem cells and defines a few major unanswered questions in the field.

Le pelage des mammifères, comme la chevelure de l'Homme, est exposé à l'environnement. Il subit des agressions et ne saurait durer toute la vie. La régénération périodique des follicules pileux est donc une nécessité. Ainsi, le poil et le cheveu ont une croissance cyclique qui comporte une phase de croissance active (ou anagène), suivie d'une phase de régression (ou catagène), et d'une phase de quiescence (ou télogène). Le follicule pileux en anagène est constitué de huit couches cylindriques de cellules épithéliales : la cuticule, la médulla et le cortex qui forment la tige

pilaire, les couches d'Huxley et de Henle, et une cuticule qui forment la gaine épithéliale interne, la couche compagnon et la gaine épithéliale externe. Le follicule pileux en anagène comporte à sa base le bulbe pileux, dont la matrice contient des kératinocytes et les cellules pigmentaires différenciées, les mélanocytes. Les précurseurs de ces mélanocytes sont intercalés parmi les cellules épithéliales dans la gaine épithéliale externe (Figure 1A). Les kératinocytes de la matrice ont une forte activité mitotique, à l'origine de la tige pilaire, et les mélanocytes synthétisent les pigments colorant la

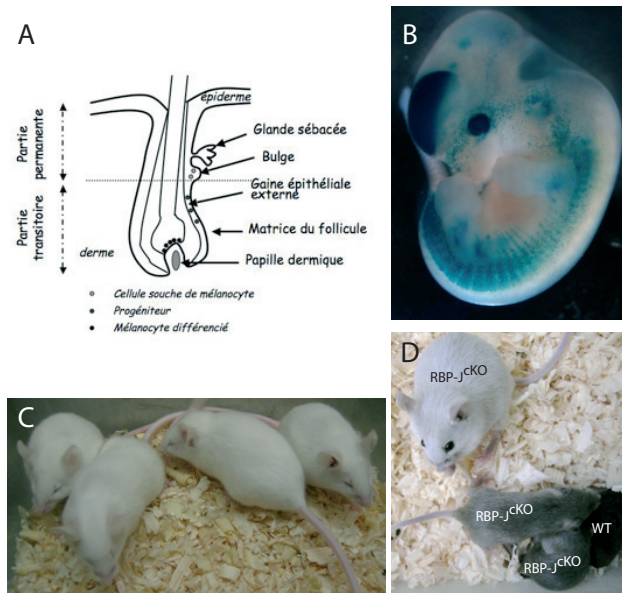


Fig. 1. Le lignage des cellules pigmentaires et quelques anomalies. **Figure 1A** : La population des cellules souches des mélanocytes est localisée dans la partie permanente du follicule pileux, dans un épaissement de la gaine épithéliale externe (appelé le *bulge*). Les progéniteurs migrent dans la gaine épithéliale externe vers la matrice du follicule où ils se différencient en mélanocytes matures, pigmentés. **Figure 1B** : Un embryon transgénique *Dct-lacZ* au 12^{ème} jour de la gestation. Les mélanoblastes sont détectés grâce à l'expression d'une β -galactosidase bactérienne. A ce stade de l'embryogenèse, les mélanoblastes prolifèrent dans le mésenchyme, sous la peau. **Figure 1C** : Des souris homozygotes pour la mutation *Mitf^{mi-vga9}*. Ces souris sont totalement dépourvues de cellules pigmentaires épidermiques ; elles sont viables et fertiles. **Figure 1D** : L'inactivation conditionnelle du gène *RbpJ* (*RBPJ^{cKO}*) dans le lignage mélanocytaire accélère le processus de grisonnement des poils. A l'âge de deux semaines (deux souriceaux en bas de l'image), le pelage des souris *RBPJ^{cKO}* est déjà nettement plus clair que celui du frère de portée de génotype sauvage (WT). A l'âge de deux mois (souris adulte en haut à gauche), les individus *RBPJ^{cKO}* ont un pelage gris très pâle, presque blanc.

tige pileuse. L'organisation des cellules de la matrice et le mode de production des huit couches cylindriques du follicule en anagène ont été établis récemment par une analyse clonale (Legue & Nicolas, 2005). La phase anagène est suivie de la phase catagène au cours de laquelle les cellules du bulbe font l'objet de processus de dédifférenciation terminale et d'apoptose, qui conduisent à l'involution rapide de la partie profonde du follicule. En conséquence, le follicule pileux se raccourcit pour atteindre sa taille minimale pendant la phase télogène. Les activités prolifératives et biochimiques du follicule en télogène atteignent leur niveau

minimal. En fin de télogène, la régénération du follicule pileux démarre à partir d'un épaissement de la gaine épithéliale externe, au point d'attachement du muscle arrecteur du poil (Figure 1A). Les anglophones appellent cet épaissement de la gaine épithéliale externe le *bulge*, un emprunt du vieux français « bouloge » qui désignait un petit sac de cuir, un porte-monnaie. Des cellules issues de cet épaissement construisent un cylindre tissulaire qui s'enfonce dans l'épiderme et à l'intérieur duquel s'organisent et se différencient tous les composants du nouveau follicule. Le renouvellement des poils et des cheveux, pendant toute la vie de l'individu, implique l'existence de populations de cellules dites « souches » capables de régénérer de manière itérative les différents composants du follicule pileux, en particulier les kératinocytes, à l'origine de la tige pileuse, et les mélanocytes responsables de sa couleur. Tous les mélanocytes différenciés du follicule meurent par apoptose durant la phase catagène du cycle N (Tobin *et al.*, 1998). Cependant la couleur des poils des souris portant les mutations *brown light* (*Tyrp1^{B-lt}*) et *patchwork* (*pwk*) implique que les mélanocytes différenciés du follicule au cycle N+1 dérivent de progéniteurs non différenciés déjà présents à l'intérieur du follicule au cycle N (Aubin-Houzelstein & Panthier, 1999 ; Johnson & Jackson, 1992). Où sont localisés les progéniteurs des mélanocytes dans le follicule pileux ? Quels sont les mécanismes qui contrôlent leur différenciation en mélanocytes pigmentés, matures ? Ce sont ces questions qu'aborde la présente revue à la lumière des recherches récentes sur les mélanocytes et leurs précurseurs.

Le lignage des cellules pigmentaires et les cellules souches des mélanocytes

Le follicule pileux associe des lignages cellulaires qui ont des origines embryologiques différentes. Les kératinocytes sont dérivés de l'ectoderme. Les mélanocytes sont dérivés de la crête neurale. On peut suivre les précurseurs des mélanocytes - les mélanoblastes - dans l'embryon de souris grâce à des anticorps dirigés contre plusieurs protéines exprimées dans ces cellules : KIT - le récepteur du Stem cell factor (SCF, ou KITL pour *kit ligand*) -, la dopachrome tautomérase (DCT) - une enzyme de la voie de biosynthèse des pigments de mélanine -, et les facteurs de transcription MITF ou PAX3. Un transgène, *Dct-lacZ*, et une collection d'insertions ciblées du gène rapporteur *lacZ*, *Kit^{lacZ}*, *Sox10^{lacZ}* et *Pax3^{lacZ}*, permettent également de visualiser les mélanoblastes qui expriment la β -galactosidase bactérienne chez les individus hétérozygotes pour ces allèles (Bernex *et al.*, 1996 ; Britsch *et al.*, 2001 ; Mackenzie *et al.*, 1997 ; Relaix

et al., 2003). Dès le 9^{ème} jour de gestation (E9), on voit apparaître dans la crête neurale, entre l'ectoderme de surface et la partie dorsale du tube neural, des cellules qui expriment le récepteur KIT. Ces cellules KIT positives (KIT⁺) sont des mélanoblastes (Wilson *et al.*, 2004). A partir de E10, ces précurseurs migrent dans le mésenchyme entre le dermo-myotome et l'épiderme, le long de la voie dorsolatérale; ils expriment alors plusieurs gènes distinctifs : *Kit*, *Dct*, *Pax3*, *Mitf* et *Sox10*. Entre E12 et E13, les mélanoblastes migrent dans l'épiderme où ils prolifèrent (Figure 1B). Entre E14 et E17, les mélanoblastes épidermiques se regroupent et migrent activement vers les follicules pileux en formation qu'ils colonisent. Une première fraction migre dans la région du *bulge*, où ils résident, sans se différencier, jusqu'à ce qu'ils soient stimulés; une seconde fraction s'enfonce jusqu'à la matrice du follicule où ils se différencient en mélanocytes matures. A la naissance, la majorité des mélanocytes épidermiques et leurs précurseurs sont localisés dans les follicules pileux.

Plusieurs approches expérimentales ont permis de localiser les cellules souches des mélanocytes dans le follicule pileux. Un outil déterminant a été fourni par un anticorps monoclonal particulier, nommé ACK2. L'anticorps ACK2 est dirigé contre le récepteur KIT. ACK2 bloque la fonction du récepteur KIT, nécessaire à la survie des mélanoblastes. L'injection par voie intra-péritonéale de l'anticorps ACK2 à des souris nouveau-nées induit la mort par apoptose des mélanocytes et conduit à des souriceaux dépigmentés (Okura *et al.*, 1995). Cependant, ces mêmes individus sont pigmentés deux mois plus tard. Cela implique que des mélanoblastes présents dans les follicules pileux des nouveau-nés ont résisté à l'action d'ACK2 et ont été capables de peupler les follicules du cycle suivant. Quelques mélanoblastes survivants sont effectivement observés 3 jours après l'injection par ACK2; ils sont localisés dans la gaine épithéliale externe au niveau du *bulge* (Nishimura *et al.*, 2002). Une population de mélanoblastes KIT négatifs, et à ce titre insensibles à l'action d'ACK2, réside normalement dans cette région du follicule (Botchkareva *et al.*, 2001). Cette population est devenue candidate pour la population de mélanocytes souches. Une caractéristique des cellules souches a souvent été utilisée pour les identifier : ce sont des cellules qui se divisent rarement. Ainsi, après injection intrapéritonéale de 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) à des souris, on peut repérer les cellules qui se divisent peu, dont les cellules souches, par le fait qu'elles retiennent longtemps le BrdU. La quiescence des cellules souches est décrite comme le moyen le plus simple de limiter le nombre de mutations nées des erreurs de réplication, et donc de protéger le lignage cellulaire correspondant des cancers (Cairns, 2006). Les mélanoblastes qui retiennent

le plus longtemps le BrdU, et donc se divisent peu, sont justement ceux qui sont dans la gaine épithéliale externe au niveau du muscle arrecteur du poil, confortant l'idée que les cellules souches des mélanocytes sont dans le *bulge*. La démonstration de la localisation des cellules souches des mélanocytes a été fonctionnelle : seul le *bulge* contient des précurseurs qui, une fois greffés dans la peau de souris nouveau-nées albinos, sont capables de pigmenter les poils albinos, dont les propres mélanocytes sont non fonctionnels (Nishimura *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que des mélanoblastes isolés de l'épiderme d'embryon au 15^{ème} jour de la gestation et cultivés dans des conditions particulières - sur des kératinocytes en présence des facteurs de croissance KITL et FGF2 - peuvent également coloniser la région du *bulge* de follicules étrangers, après avoir été greffés; ils participent alors à la pigmentation de la tige pileuse produite lors de plusieurs cycles successifs. Ces mélanoblastes greffés ont acquis les propriétés de cellules souches après avoir séjourné dans la région du *bulge*. Le *bulge* paraît donc fournir un microenvironnement spécifique, une niche, nécessaire à l'établissement et au maintien des cellules souches (Yonetani *et al.*, 2007). Pour résumer, il existe, dans la région du *bulge* des souris adultes, une population de mélanoblastes non différenciés, c'est-à-dire ne contenant pas de granules de mélanine, quiescents et capables de donner naissance à des progéniteurs. Au début de la phase anagène, ces progéniteurs migrent avec les kératinocytes de la gaine épithéliale externe dans la profondeur du derme pour atteindre la matrice du follicule. Là, ils synthétisent des pigments de mélanine qui sont transférés aux kératinocytes de la tige pileuse en formation.

Dérégulation spontanée des mécanismes contrôlant le nombre de cellules souches des mélanocytes.

Les cellules souches sont capables (1) de s'auto-renouveler de façon prolongée, voire indéfiniment, une caractéristique essentielle pour leur maintien, et (2) de produire des progéniteurs, ayant un pouvoir prolifératif important, qui se différencient en cellules matures spécifiques d'un ou plusieurs lignages cellulaires. Le processus qui aboutit à la production de cellules matures à partir de cellules souches doit être finement contrôlé. En effet, un déficit en cellules souches peut se traduire à terme par la disparition du ou des lignages cellulaires correspondants, ce qui a généralement des effets délétères sur la santé de l'individu. A l'inverse, un excès de cellules souches et/ou de progéniteurs se traduit par une hyperplasie et éventuellement

par l'apparition d'une tumeur. La manifestation clinique d'un défaut dans le renouvellement des cellules souches des mélanocytes peut être observée quotidiennement chez nos aînés. Il a en effet été montré que le grisonnement des cheveux de l'homme est dû à une diminution du nombre des progéniteurs de mélanocytes de la gaine épithéliale externe et des mélanocytes de la matrice. Les cheveux blancs de l'homme âgé ne contiennent plus de progéniteurs ni de mélanocytes (Commo *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2005). Le grisonnement des poils des souris âgées s'accompagne des mêmes anomalies (Nishimura *et al.*, 2005). L'interprétation de ces observations est que le grisonnement des cheveux et des poils résulte d'une disparition progressive de la population des cellules souches de mélanocytes.

L'hypothèse de l'existence d'une " cellule souche cancéreuse " suggère que les tumeurs malignes contiennent une hiérarchie de cellules cancéreuses qui ressemble à celle du tissu normal dont elles sont issues. Selon cette hypothèse, la cellule souche cancéreuse aurait un fort potentiel prolifératif et produirait des progéniteurs plus différenciés, au potentiel prolifératif plus réduit. L'existence de cellules souches cancéreuses est documentée dans les leucémies (Blair *et al.*, 1998; Lapidot *et al.*, 1994) et dans plusieurs tumeurs solides, comme les tumeurs du sein et les glioblastomes (Al-Hajj *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003). Les observations en faveur de l'idée selon laquelle les tumeurs malignes se développeraient à partir de cellules souches somatiques adultes s'accumulent (Clarke & Fuller, 2006). Qu'en est-il des mélanomes cutanés malins? Démarrent-ils à partir de cellules souches de mélanocytes? Chez la souris, la majorité des mélanocytes et de leurs précurseurs sont confinés dans les follicules pileux. On devrait donc être capable de savoir si les mélanomes malins cutanés de la souris démarrent dans la région du *bulge* des follicules. L'accès aux stades précoces de la tumorigenèse est très difficile chez la souris de génotype sauvage car ce mammifère ne développe qu'exceptionnellement des mélanomes cutanés spontanés. La combinaison de mutations gain de fonction dans des proto-oncogènes (comme *H-Ras*^{G12V}) et perte de fonction dans des gènes suppresseurs de tumeur (comme *Cdkn2a*) permet d'augmenter l'incidence des mélanomes cutanés. Cependant, les souris *Tyr-Ras*^{G12V}; *Cdkn2a*^{-/-} développent des mélanomes d'origine dermique, et non pas épidermique (Chin *et al.*, 1997). Les souris portant un transgène comprenant le promoteur du gène de la métallothionéine 1 fusionné aux séquences codantes du facteur de croissance des hépatocytes HGF/SF sont caractérisées par une accumulation de mélanocytes dans l'épiderme, le derme et la jonction dermo-épidermique; ces souris développent spontanément ou après exposition

aux ultraviolets des mélanomes cutanés d'origine épidermique (Otsuka *et al.*, 1998). Certaines tumeurs semblent être situées à proximité de follicules pileux mais on ne peut pas affirmer qu'elles y trouvent leur origine (voir la Figure 1D dans Noonan *et al.*, 2001). Un modèle récent donne des arguments plus solides en faveur de l'hypothèse de la cellule souche de mélanome : les souris *Tyr-β-cat*; *Tyr-N-Ras*^{Q61K}, qui expriment d'une part une forme activée de la β-caténine et d'autre part l'oncogène *N-Ras* dans les mélanocytes et leurs précurseurs, développent fréquemment des mélanomes cutanés d'origine épidermique. Chez ces souris, les mélanomes semblent se développer à partir de la gaine épithéliale externe au niveau du *bulge* (voir la Figure 2C dans Delmas *et al.*, 2007). Les progrès récents de l'imagerie non invasive utilisant un microscope confocal à balayage laser en mode réflexion permettent aujourd'hui de détecter des tumeurs cutanées d'un diamètre égal à 0,7 mm, ce qui devrait faciliter la détection et le suivi des stades les plus précoces de la tumorigenèse et permettre d'identifier avec précision les sites d'origine des mélanomes cutanés (Gareau *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, on peut noter que trois marqueurs de cellules souches, CD166, CD133, et la nestine, normalement exprimés respectivement dans les cellules souches mésenchymateuses, les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs des cellules endothéliales, et les cellules souches neuroépithéliales, sont surexprimés dans des mélanomes primaires et métastatiques par rapport aux naevus (Klein *et al.*, 2007). Si les cellules CD166⁺ CD133⁺ Nestine⁺ sont des cellules souches cancéreuses, cette observation suggère que les cellules souches des mélanomes dérivent des cellules souches des mélanocytes. Des expériences récentes ont également révélé l'existence de cellules ayant les propriétés de cellules souches adultes dans des mélanomes métastatiques humains. Des cellules dissociées de mélanomes métastatiques prélevés sur des patients en salle d'opération et placées dans le milieu de culture standard de cellules embryonnaires souches humaines forment en deux semaines des agrégats de cellules non adhérentes, appelées des sphères. Les cellules des sphères expriment des protéines spécifiques du lignage mélanocytaire et sont capables après dissociation et repiquage à densité clonale de redonner naissance à de nouvelles sphères. Ces cellules sont également capables de se différencier en mélanocytes matures, pigmentés, lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu de différenciation des mélanocytes. De plus, les cellules des sphères forment des tumeurs pigmentées lorsqu'elles sont injectées à des souris immunotolérantes et les cellules des tumeurs sont elles-mêmes tumorigènes (Fang *et al.*, 2005). En conclusion une population de cellules dotées d'un fort

potentiel prolifératif, douées d'autorenouvellement, capables de se différencier en mélanocytes matures et de former des mélanomes, existent dans des mélanomes métastatiques de l'homme. Un objectif est maintenant de connaître les propriétés que partagent ces cellules et les cellules souches des mélanocytes de l'adulte.

Les mutations affectant la biologie des cellules souches des mélanocytes

La compréhension des mécanismes contrôlant l'autorenouvellement des cellules souches et leur différenciation en progéniteurs et en cellules différenciées matures est un enjeu important des recherches actuelles en biologie. Le lignage mélanocytaire est particulièrement propice à ces recherches. En effet, il n'est pas indispensable à la vie de l'individu et les souris dépourvues de mélanocytes épidermiques et de leurs précurseurs sont viables (Figure 1C). De plus, les cellules souches des mélanocytes, les progéniteurs et les cellules différenciées occupent trois sites anatomiques distincts : la région du *bulge*, la gaine épithéliale externe entre le muscle arrecteur du poil et la matrice, et la matrice du poil, respectivement. Enfin, chacun de ces trois types cellulaires peut être distingué sur la base des marqueurs qu'il exprime : les cellules souches sont PAX3⁺DCT⁺KIT⁻TRP1⁻, les progéniteurs PAX3⁺DCT⁺KIT⁺TRP1⁺ et les mélanocytes PAX3⁺DCT⁺KIT⁺TRP1⁺ mélanine⁺ (voir également Osawa *et al.*, 2005).

L'étude des mutations affectant les mécanismes moléculaires et cellulaires du renouvellement et de la différenciation des cellules souches mélanocytaires devrait être riche d'informations nouvelles. Formellement, ces mutations peuvent affecter chacune des quatre étapes successives : la constitution de la population de cellules souches dans la région du *bulge*, l'autorenouvellement des cellules souches, la production des progéniteurs à partir des cellules souches et/ou la différenciation des progéniteurs en mélanocytes matures. On peut prédire que les gènes impliqués dans ces processus sont nombreux. L'identification des mutants devrait donc être aisée. Cependant, seulement deux mutations spontanées, vitiligo (*Mitf^{mi-vit}*) et patchwork (*pwk*), affectent le devenir des mélanoblastes à l'intérieur du follicule pileux (Aubin-Houzelstein *et al.*, 1998; Kurita *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2005). Comment expliquer ce paradoxe? Une centaine de locus de pigmentation sont connus chez la souris et de nombreux allèles spontanés ont été décrits à certains d'entre eux (66 au locus *Kit*, 56 au locus *non agouti*), ce qui a pu laisser croire que tous les

gènes de pigmentation avaient été localisés dans le génome de ce mammifère modèle. Il n'en est rien. Des gènes de pigmentation identifiés chez d'autres espèces n'étaient pas connus chez la souris (Candille *et al.*, 2007; Lamason *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est raisonnable de penser que des mutations affectant la biologie des cellules souches de mélanocytes peuvent avoir des effets pléiotropes et toucher d'autres lignages indispensables, eux, à la vie de l'individu. Les mutants correspondants ne sont pas identifiés car ils ne sont pas viables. Enfin les mutations qui conduisent à une absence de follicule pileux (comme *Foxn1^{nu}* et *Trp63^{tm1Fmc}*) ou à la disparition des mélanoblastes (*Kit^{W-v}* et *Mitf^{mi-vgg9}*) ne permettent pas d'analyser un rôle éventuel des gènes correspondants sur la biologie du lignage mélanocytaire dans le follicule pileux. Pour ces raisons, de nombreuses mutations affectant les cellules souches des mélanocytes et leur différenciation restent à découvrir. On peut penser qu'il s'agira le plus souvent de mutations conditionnelles, fabriquées à façon. Certaines d'entre elles ont déjà été identifiées.

Le gène *Atr* est essentiel pour maintenir l'intégrité du génome, il intervient en cas de dommages à l'ADN en inhibant la progression du cycle cellulaire pour éviter la formation de cassures double brin (revue dans Hurley & Bunz, 2007). Son inactivation dans la lignée germinale conduit à une létalité embryonnaire précoce (de Klein *et al.*, 2000). La délétion du gène *Atr* induite par l'injection de tamoxifène à des souris adultes de génotype *Atr^{flox/-}*; CreERT2 se traduit par des signes de vieillissement précoce avec, en particulier, un grisonnement du pelage (Ruzankina *et al.*, 2007). Il est probable que ce grisonnement est dû à l'épuisement progressif de la population des cellules souches des mélanocytes dans le follicule pileux.

Bcl2 a des fonctions anti-apoptotiques dans plusieurs tissus. Son inactivation dans la lignée germinale conduit à des souriceaux *Bcl2^{-/-}* normalement pigmentés, mais dont le pelage devient gris de façon abrupte au début du second cycle pileux, entre l'âge de 4 et 5 semaines (Nakayama *et al.*, 1994). Chez les souriceaux *Bcl2^{-/-}* de 6 jours, des mélanoblastes meurent par apoptose dans la gaine épithéliale externe. Il a donc tout d'abord été suggéré que *Bcl2* était nécessaire au maintien des cellules souches dans leur niche (Nishimura *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été montré qu'en l'absence de *Bcl2*, aucune cellule souche de mélanocytes n'est détectable dans le follicule pileux du nouveau-né. *Bcl2* est donc indispensable à l'émergence de la population de cellules souches dans la région du *bulge* à partir des mélanoblastes qui colonisent le follicule en formation à la fin de l'embryogenèse (Mak *et al.*, 2006).

Le facteur de transcription MITF (*microphthalmia transcription factor*) est déterminant pour le

développement des mélanocytes. Son expression forcée dans des fibroblastes 3T3 NIH les amène à former des dendrites et à exprimer *Tyr* et *Tyrp1*, des gènes de la mélanogenèse (Tachibana *et al.*, 1996). L'expression de nombreux gènes de la pigmentation est régulée par MITF, en particulier *Kit*, *Tyr*, *Tyrp1*, *Dct*, *Mc1r* (revue dans Steingrimsson *et al.*, 2004). On connaît aujourd'hui 26 allèles au locus *Mitf*. L'un d'entre eux, vitiligo (*Mitf^{mi-vit}*), est associé à un phénotype unique dans la série allélique. Les souris *Mitf^{mi-vit/mi-vit}* sont caractérisées par un lent grisonnement s'étendant sur une période d'environ un an. Dans la gaine épithéliale externe des follicules pileux *Mitf^{mi-vit/mi-vit}*, on observe la diminution progressive du nombre de mélanoblastes et la présence, anormale à ce site, de mélanocytes différenciés (Nishimura *et al.*, 2005). Cette disparition mime de façon accélérée ce que l'on observe lors du grisonnement naturel des cheveux et des poils chez l'homme et l'animal avec une différence notable : aucune différenciation anticipée de mélanoblastes n'a été rapportée lors du vieillissement naturel. La mutation *vitiligo* est causée par une mutation ponctuelle substituant le résidu 222 de la protéine, un acide aspartique, en asparagine. La raison pour laquelle la protéine MITF codée par l'allèle vitiligo conduit à la disparition anticipée des cellules souches et des progéniteurs dans les follicules pileux est inconnue.

Les gènes *Notch* constituent une famille de quatre gènes (*Notch1-4*) codant des récepteurs activés par des ligands spécifiques, appelés DELTA-LIKE 1, 3, et 4 et JAGGED 1 et 2. La liaison du ligand au récepteur induit deux clivages protéolytiques qui libèrent le domaine intracellulaire de NOTCH, appelé NICD ; NICD est alors transloqué dans le noyau où il s'associe au facteur de transcription RBPJ κ pour constituer un complexe transactivateur, qui initie la transcription des gènes cibles de la voie dont les répresseurs *Hes* (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). La voie de signalisation Notch est essentielle durant le développement embryonnaire et chez l'adulte dans de nombreux tissus (revue dans Wilson & Radtke, 2006). L'inactivation conditionnelle du gène *RbpJ κ* (RBPJ κ^{cKO}) dans les mélanoblastes conduit à des souris dont le pelage grisonne, pour devenir presque blanc en quelques mois (Figure 1D). Le nombre de mélanocytes de la matrice et de leurs progéniteurs dans la gaine épithéliale externe, y compris dans la région du *bulge*, diminue progressivement entre l'âge de 4 et 32 jours. Des expériences complémentaires suggèrent que la voie de signalisation Notch protège les cellules souches des mélanocytes de l'apoptose (Moriyama *et al.*, 2006). Il était raisonnable de prédire que l'inactivation d'un récepteur NOTCH conduirait au même phénotype que celui observé chez les souris RBPJ κ^{cKO} . En réalité, seules les souris portant

une inactivation conditionnelle de trois des quatre allèles de *Notch1* et *Notch2*, c'est-à-dire les souris *TyrCre ; Notch1^{flox/flox} ; Notch2^{flox/+}* ou *TyrCre ; Notch1^{flox/+} ; Notch2^{flox/flox}* présentent un grisonnement précoce comparable à celui des souris RBPJ κ^{cKO} , ce qui indique que deux des quatre gènes de la famille *Notch* contribuent au maintien d'une population fonctionnelle de cellules souches des mélanocytes dans le follicule pileux (Schouwey *et al.*, 2007).

Ce bilan des mutations qui affectent le devenir des cellules souches des mélanocytes dans le follicule pileux ressemble pour l'instant à un inventaire de Jacques Prévert. La compréhension des relations entre les gènes *Notch/RBPJ κ* et *Mitf*, qui confèrent des phénotypes semblables lorsqu'ils sont mutés, devrait permettre de cerner le rôle spécifique de la voie de signalisation Notch dans la biologie des cellules souches des mélanocytes. L'identification d'autres mutations affectant ce même processus permettrait de mieux cerner les différentes étapes de la biologie des cellules souches des mélanocytes. Les voies de signalisation Wnt/ β -caténine, NF κ B, TGF β , Sonic hedgehog et EGFR contrôlent le devenir des cellules souches d'autres lignages ; leur éventuelle implication dans la biologie des cellules souches des mélanocytes n'est pas claire à ce jour. La dissection des mécanismes qui gouvernent le renouvellement et la différenciation des cellules souches des mélanocytes est un enjeu majeur des équipes travaillant sur les cellules pigmentaires normales et pathologiques pour les prochaines années.

Les mélanocytes matures synthétisent la mélanine dans des organelles spécifiques, les mélanosomes. Les mélanosomes sont transportés dans les dendrites et transférés aux kératinocytes adjacents. Des expériences récentes indiquent que les kératinocytes qui reçoivent le pigment synthétisé par les mélanocytes de la matrice du follicule pileux sont caractérisés par l'expression du gène *Foxn1*, qui désigne ainsi le destinataire final du pigment (Weiner *et al.*, 2007). Cette observation révèle la nécessaire coordination entre les cellules productrices et receveuses du pigment et souligne l'importance des mécanismes qui gouvernent les contacts entre les cellules des différents lignages dans le follicule pileux. Dans ce contexte, on ne peut être que frappé par la présence dans le *bulge* des cellules souches de deux lignages différents : les cellules souches des mélanocytes et des kératinocytes. Comment sont organisées du point de vue anatomique ces deux populations cellulaires distinctes ? Quelle est la nature de l'environnement singulier qui constitue la niche de ces cellules souches ? Comment s'organise dans le temps et dans l'espace le réveil des deux types de cellules souches pour former un nouveau follicule pileux à partir de cette région ? La réponse à ces questions est aujourd'hui à la portée de l'expérimentateur.

Références

- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J. and Clarke M.F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2003, 100, 3983-3988.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D. and Lake R.J., Notch signaling : cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, 284, 770-776.
- Aubin-Houzelstein G., Bernex F., Elbaz C. and Panthier J.J., Survival of patchwork melanoblasts is dependent upon their number in the hair follicle at the end of embryogenesis. *Dev. Biol.*, 1998, 198, 266-276.
- Aubin-Houzelstein G. and Panthier J.J., The patchwork mouse phenotype : implication for melanocyte replacement in the hair follicle. *Pigment Cell. Res.*, 1999, 12, 181-186.
- Bernex F., De Sepulveda P., Kress C., Elbaz C., Delouis C. and Panthier J.J., Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development*, 1996, 122, 3023-3033.
- Blair A., Hogge D.E. and Sutherland H.J., Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR. *Blood*, 1998, 92, 4325-4335.
- Botchkareva N.V., Khlgatian M., Longley B.J., Botchkarev V.A. and Gilchrist B.A., SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *Faseb J.*, 2001, 15, 645-658.
- Britsch S., Goerich D.E., Riethmacher D., Peirano R.I., Rossner M., Nave K.A., Birchmeier C. and Wegner M., The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.*, 2001, 15, 66-78.
- Cairns J., Cancer and the immortal strand hypothesis. *Genetics*, 2006, 174, 1069-1072.
- Candille S.I., Kaelin C.B., Cattanch B.M., Yu B., Thompson D.A., Nix M.A., Kerns J.A., Schmutz S.M., Millhauser G.L. and Barsh G.S., A β -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science*, 2007, 314, 1418-1423.
- Chin L., Pomerantz J., Polsky D., Jacobson M., Cohen C., Cordon-Cardo C., Horner J.W., 2nd and DePinho R.A., Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.*, 1997, 11, 2822-2834.
- Clarke M.F. and Fuller M., Stem cells and cancer : two faces of eve. *Cell*, 2006, 124, 1111-1115.
- Commo S., Gaillard O. and Bernard B.A., Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath. *Br J. Dermatol*, 2004, 150, 435-443.
- de Klein A., Muijtjens M., van Os R., Verhoeven Y., Smit B., Carr A.M., Lehmann A.R. and Hoeijmakers J.H., Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr. Biol.*, 2000, 10, 479-482.
- Delmas V., Beermann F., Martinozzi S., Carreira S., Ackermann J., Kumasaka M., Denat L., Goodall J., Luciani F., Viros A., Demirkan N., Bastian B.C., Goding C.R. and Larue L., β -Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & Dev.*, 2007, 21, 2923-2935.
- Fang D., Nguyen T.K., Leishear K., Finko R., Kulp A.N., Hotz S., Van Belle P.A., Xu X., Elder D.E. and Herlyn M., A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 2005, 65, 9328-9337.
- Gareau D.S., Merlino G., Corless C., Kulesz-Martin M. and Jacques S.L., Noninvasive imaging of melanoma with reflectance mode confocal scanning laser microscopy in a murine model. *J. Invest. Dermatol.*, 2007, 127, 2184-2190.
- Hurley P.J. and Bunz F., ATM and ATR : components of an integrated circuit. *Cell Cycle*, 2007, 6, 414-417.
- Johnson R. and Jackson I.J., Light is a dominant mouse mutation resulting in premature cell death. *Nat. Genet.*, 1992, 1, 226-229.
- Klein W.M., Wu B.P., Zhao S., Wu H., Klein-Szanto A.J. and Tahan S.R., Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol*, 2007, 20, 102-107.
- Kurita K., Nishito M., Shimogaki H., Takada K., Yamazaki H. and Kunisada T., Suppression of progressive loss of coat color in microphthalmia-vitiligo mutant mice. *J. Invest. Dermatol.*, 2005, 125, 538-544.
- Lamason R.L., Mohideen M.A., Mest J.R., Wong A.C., Norton H.L., Aros M.C., Juryne M.J., Mao X., Humphreville V.R., Humbert J.E., Sinha S., Moore J.L., Jagadeeswaran P., Zhao W., Ning G., Makalowska I., McKeigue P.M., O'Donnell D., Kittles R., Parra E.J., Mangini N.J., Grunwald D.J., Shriver M.D., Canfield V.A. and Cheng K.C., SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, 2005, 310, 1782-1786.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M.A. and Dick J.E., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 1994, 367, 645-648.
- Legue E. and Nicolas J.F., Hair follicle renewal : organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development*, 2005, 132, 4143-4154.
- Mackenzie M.A., Jordan S.A., Budd P.S. and Jackson I.J., Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.*, 1997, 192, 99-107.
- Mak S.S., Moriyama M., Nishioka E., Osawa M. and Nishikawa S., Indispensable role of Bcl2 in the development of the melanocyte stem cell. *Dev. Biol.*, 2006, 291, 144-153.
- Moriyama M., Osawa M., Mak S.S., Ohtsuka T., Yamamoto N., Han H., Delmas V., Kageyama R., Beermann F., Larue L. and Nishikawa S., Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of

- melanoblasts and melanocyte stem cells. *J. Cell. Biol.*, 2006, 173, 333-339.
- Nakayama K., Nakayama K., Negishi I., Kuida K., Sawa H. and Loh D.Y., Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice : occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1994, 91, 3700-3704.
- Nishimura E.K., Jordan S.A., Oshima H., Yoshida H., Osawa M., Moriyama M., Jackson I.J., Barrandon Y., Miyachi Y. and Nishikawa S., Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*, 2002, 416, 854-860.
- Nishimura E.K., Granter S.R. and Fisher D.E., Mechanisms of hair graying : incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science*, 2005, 307, 720-724.
- Noonan F.P., Recio J.A., Takayama H., Duray P., Anver M.R., Rush W.L., De Fabo E.C. and Merlino G., Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature*, 2001, 413, 271-272.
- Okura M., Maeda H., Nishikawa S. and Mizoguchi M., Effects of monoclonal anti-c-kit antibody (ACK2) on melanocytes in newborn mice. *J. Invest. Dermatol.*, 1995, 105, 322-328.
- Osawa M., Egawa G., Mak S.S., Moriyama M., Freter R., Yonetani S., Beermann F. and Nishikawa S., Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development*, 2005, 132, 5589-5599.
- Otsuka T., Takayama H., Sharp R., Celli G., LaRochelle W.J., Bottaro D.P., Ellmore N., Vieira W., Owens J.W., Anver M. and Merlino G., c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res.*, 1998, 58, 5157-5167.
- Relaix F., Polimeni M., Rocancourt D., Ponzetto C., Schafer B.W. and Buckingham M., The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. *Genes Dev.*, 2003, 17, 2950-2965.
- Ruzankina Y., Pinzon-Guzman C., Asare A., Ong T., Pontano L., Cotsarelis G., Zediak V., Velez A., Bhandoola A. and Brown E.J., Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell.*, 2007, 1, 113-126.
- Schouwey K., Delmas V., Larue L., Zimmer-Strobl U., Strobl L.J., Radtke F. and Beermann F., Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. *Dev. Dyn.*, 2007, 236, 282-289.
- Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J. and Dirks P.B., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.*, 2003, 63, 5821-5828.
- Steingrimsson E., Copeland N.G. and Jenkins N.A., Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.*, 2004, 38, 365-411.
- Tachibana M., Takeda K., Nobukuni Y., Urabe K., Long J.E., Meyers K.A., Aaronson S.A. and Miki T., Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat. Genet.*, 1996, 14, 50-54.
- Tobin D.J., Hagen E., Botchkarev V.A. and Paus R., Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen) ? *J. Invest. Dermatol.*, 1998, 111, 941-947.
- Weiner L., Han R., Scicchitano B.M., Li J., Hasegawa K., Grossi M., Lee D. and Brissette J.L., Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell*, 2007, 130, 932-942.
- Wilson A. and Radtke F., Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett.*, 2006, 580, 2860-2868.
- Wilson Y.M., Richards K.L., Ford-Perriss M.L., Panthier J.J. and Murphy M., Neural crest cell lineage segregation in the mouse neural tube. *Development*, 2004, 131, 6153-6162.
- Yonetani S., Moriyama M., Nishigori C., Osawa M. and Nishikawa S.I., In Vitro Expansion of Immature Melanoblasts and their Ability to Repopulate Melanocyte Stem Cells in the Hair Follicle. *J Invest Dermatol*, 2008, 128, 408-420.