
N° d'ORDRE : 3240

THESE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : *DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1*

Mention: Biologie

PAR

SEBASTIEN CORRE

Equipe d'accueil : Equipe Génétique Humaine

UMR 6061 CNRS Génétique et Développement

Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé

Composante Universitaire : SVE

**REGULATION UV-DEPENDANTE DES GENES DE LA
PIGMENTATION : IMPLICATION DU FACTEUR DE
TRANSCRIPTION USF-1 (UPSTREAM STIMULATING FACTOR 1)**

SOUTENUE LE 9 Décembre 2005 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Madame Marie-Dominique GALIBERT :	responsable de thèse
Monsieur André GUILLOUZO :	examinateur
Monsieur Colin GODING :	examinateur
Monsieur Lionel LARUE :	rapporteur
Monsieur Jean Yves LE GALL	directeur de thèse
Monsieur Michel PHILIPPE :	examinateur
Monsieur Alain TAIEB :	rapporteur

UNIVERSITE DE RENNES 1

Président de l'Université	M. B. FORTIN
Vice-Président Fédération Santé	M. J. GOASGUEN
Vice-Président Fédération Sciences	M. R. MARIE
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. H. CAILLEAU
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. JM. BOISSOLES
Secrétaire Générale	Mme. A. JULIEN

FEDERATION SANTE

UFR de Médecine de Rennes	Directeur : M. F. GUILLE
UFR d'Odontologie	Directeur : M. G. CATHELINÉAU
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. JL. BURGOT

FEDERATION SCIENCES

UFR de MATHEMATIQUES	Directeur : M. JM. LION
UFR de Sciences de la Vie et de L'Environnement	Directeur : Mme MA. RICHARD
UFR de Structure et Propriétés de la matière	Directeur : M. A. GIRARD
UFR d'Informatique	Directeur : M. O. RIDOUX

FEDERATION RECHERCHE

Génomique fonctionnelle et Santé	Directeur : M. M. PHILIPPE
Ecole Doctorale Vie Agro Santé	Directeur : M. D. BOUJARD
IFR 140 Génétique Fonctionnelle Agronomie et Santé	Directeur : M. P. PRUNET

À ma chérie,

À mes parents,

À ma sœur et mon frère,

À mes amis.

Remerciements

En préambule à ce manuscrit, je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail passionnant.

Il y a maintenant cinq ans, je découvrais pour la première fois le monde de la recherche au sein de l'UMR 6061 "Génétique et Développement". Après quelques années à l'unité, je tiens maintenant à rendre honneur aux différentes personnes qui ont participé à me faire aimer ce travail.

J'aimerais en premier lieu remercier le docteur Marie-Dominique Galibert de m'avoir accueilli au sein de sa jeune équipe il y a déjà plus de quatre ans, pour me permettre de travailler sur le sujet de la régulation transcriptionnelle et l'oncogénèse. Je tiens particulièrement à te remercier Marie-Do pour m'avoir accompagné tout au long de ma thèse et pour m'avoir conseillé dans la progression de mes travaux en me témoignant à chaque instant une entière confiance. Ces quatre années au sein de l'équipe furent un réel plaisir. J'ai pu apprendre énormément à tes côtés sur le travail de recherche, mais également profiter de l'ensemble de tes connaissances scientifiques. Merci, également pour le temps considérable passé pour la correction de ce manuscrit et des différents articles qui le composent. Je suis heureux d'être le premier étudiant à avoir réalisé ma thèse sous ta responsabilité, et je sais que les personnes qui suivront seront également ravies de travailler à tes côtés.

Je voudrais également exprimer mes remerciements à l'ensemble de l'équipe "Régulation transcriptionnelle et Oncogénèse", et à toutes les personnes qui la composent : Anne Gaëlle, Vonnick, Virginie, Yorann, Nicolas, Régis, Julien, et

Aline. Merci, aussi à l'ensemble de l'équipe "Génétique Humaine" pour la bonne ambiance de travail et pour les différentes pauses café croissants. Je voudrais particulièrement te remercier Aline après avoir partagé le plus de temps à travailler dans la bonne humeur à tes côtés. A chacun son facteur, USF-1 pour moi, Mitf pour toi, mais pour autant les mêmes soucis au quotidien et une entre aide indispensable pour progresser. Merci aussi, pour ta précieuse contribution pour la correction de ce manuscrit.

Au cours de ma thèse, j'ai eu le plaisir de travailler avec différentes personnes et différentes équipes. Je tiens à remercier ces personnes, Karim de chez Proclaim, le docteur Henri Adamski, mais également l'équipe "Génétique du chien" avec Catherine et Benoît avec qui nous avons participé à un projet de recherche sur la couleur de robe chez le chien merle. J'ai vraiment apprécié de découvrir un univers un peu différent de mon quotidien, et de pouvoir étudier notre plus fidèle compagnon.

Je voudrais aussi remercier les différentes personnes qui ont tout de suite accepté avec enthousiasme de participer à mon jury de thèse. Tout d'abord, merci au Professeur Jean-Yves Le Gall pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, en lui souhaitant maintenant de profiter d'une retraite bien méritée. Merci également à Michel Philippe et André Guillouzo d'avoir accepté d'être les examinateurs locaux de mon travail. Enfin, je voudrais remercier trois personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer pour la première fois en participant aux congrès organisés par l'ESPCR (European Society for Pigment Cell Research) à Gant, à Paris, ou encore à Washington pour le congrès international de l'IPCC en Septembre dernier. Merci au Professeur Alain Taïeb de Bordeaux, d'avoir accepté

ma sollicitation et d'avoir modifié gentiment son planning pour pouvoir participer à ma soutenance. Merci à Lionel Larue de Paris pour l'organisation parfaite du congrès ESPCR l'année dernière, et d'avoir accepté de participer à mon jury. I would finally thank you Colin Goding from Oxted for accepting to come in Brittany for my presentation, by hoping to work together in the next years.

Je ne voudrais pas oublier de remercier les personnes qui sont les plus importantes pour moi et qui m'ont soutenu et encouragé à chaque moment. Merci maman et papa pour votre amour et pour m'avoir toujours suivi tout au long de mes études, en me témoignant un sentiment de fierté de cette réussite scolaire. Merci bien sûr à toute la petite famille.

Je voudrais terminer en remerciant l'amour de ma vie Elodie, qui a dû subir tous les jours les inconvénients d'être avec un étudiant en thèse de Biologie. Chose qui n'est pas forcément facile quand on fait du droit. Merci pour avoir supporté mes sauts d'humeur et de m'avoir détendu pendant les moments un peu plus stressants. J'espère que tu pourras être fier de moi après avoir terminé cette thèse et que cela effacera les quelques moments un peu difficile que j'aurai pu te faire endurer. Merci pour ton amour et sache que rien n'est plus important que toi. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements	7
Table des matières	11
Table des illustrations	15
Liste des figures	15
Liste des tableaux	16
Abréviations	17
Thématique de recherche	19
Etude Bibliographique	23
1^{ère} partie : La pigmentation de la peau comme protection contre les rayonnements UV	25
1> La peau	27
1.1> L'épiderme	27
1.1.1> Les kératinocytes	29
1.1.2> Les mélanocytes	29
1.1.3> Les cellules de Langherans	31
1.1.4> Les cellules de Merkel	31
1.2> Le derme	31
1.3> L'hypoderme	32
2> L'influence des rayonnements UV	32
2.1> Les Vacuum-UV	33
2.2> Les UVA	33
2.3> Les UVB	35
2.4> Les UVC	36
2.5> La protection et la réparation des lésions induites par les UV	37
3> La protection de la peau	39
3.1> La mélanogénèse	39
3.2> Les rôles de la mélanine	40
4> Les mécanismes de pigmentation	41
4.1> Le rôle du couple POMC-MC1R	41
4.1.1> POMC	41
4.1.2> MC1R	43
4.1.3> Agouti	48
4.1.4> L'activation de la voie AMPc	49
4.2> Les autres voies d'activation de la pigmentation constitutive	50
4.2.1> Stem Cell Factor/Kit	50
4.2.2> Endothéline 1	51
4.2.3> FGF2	51
4.4> Le rôle du facteur de transcription Mitf	52
4.4.1> Le gène	52
4.4.2> La protéine	53
4.4.3> L'activation de la transcription	53

4.4.4> L'activation post-traductionnelle	55
4.4.5> La régulation de l'expression des différents gènes	56
4.5> Les facteurs influençant la mélanogénèse	63
4.5.1> La biodisponibilité en tyrosine	63
4.5.2> L'influence de la régulation allostérique et de l'H ₂ O ₂	63
4.5.3> L'activité tyrosinase et son association avec le type de peau	64
4.5.4> Le pH intramélanosomal	64
4.5.5> La régulation par NO	65
4.5.6> La voie PKC	65
4.6> Le transfert de la mélanine	67
4.6.1> La biogénèse des mélanosomes	67
4.6.2> Le transport des mélanosomes	68
4.6.3> Le transfert vers les kératinocytes	69
4.7> Conclusion	71
2^{ème} partie : Transformation maligne du mélanocyte et facteurs génétiques du mélanome	73
1> L'épidémiologie du mélanome	75
2> L'apparition du mélanome	75
2.1> La différenciation des mélanocytes	75
2.2> Les différents stades du développement	78
2.2.1> Généralités	78
2.2.2> Les différentes étapes de la carcinogénèse mélanocytaire	78
2.2.3> Les métastases	81
2.3> Les différents types de mélanomes	83
2.3.1> Généralités	83
2.3.2> Les critères histopronostiques	87
2.4> Les facteurs influençant l'apparition d'un mélanome	89
2.4.1> Les facteurs environnementaux	89
2.4.2> Les facteurs d'hôtes constitutionnels	90
2.3.3> Les facteurs génétiques	93
2.3.4> Les anomalies génétiques associées au mélanome	99
2.5> Les thérapies du mélanome	101
Résultats	103
1> Introduction	105
1^{ère} et 2^{ème} articles : Rôle du facteur de transcription USF-1 dans la régulation de l'expression génétique	107
2> Rôle du facteur de transcription USF-1 dans la régulation de l'expression génétique	109
2.1> Généralités	109
2.2> Copie du 1^{ère} et 2^{ème} articles	109
3^{ème} article : Etude de la régulation UV-dépendante de l'expression des gènes POMC et MC1R	129
3> Etude de la régulation UV-dépendante de l'expression des gènes POMC et MC1R	131

3.1> Généralités	131
3.2> Copie du 3ème article	131
4 ^{ème} article : Etude <i>in vivo</i> de l'expression des gènes de la pigmentation en réponse aux UV	
.....	143
4> Etude <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> de la pigmentation, deux modèles moléculaires intéressants	145
4.1> Introduction	145
4.2> Copie du 4ème article	145
5 ^{ème} article : Identification d'une nouvelle forme post-traductionnelle du facteur de transcription USF-1	159
5> Identification d'une nouvelle forme post-traductionnelle du facteur de transcription USF-1	161
5.1> Introduction	161
5.2> Copie du 5ème article	161
Discussions et Perspectives	181
1> La complémentarité fonctionnelle des facteurs de transcription	183
2> Identification des gènes cibles d'USF	184
3> Redondance des voies intracellulaires d'activation de la mélanogénèse	185
4> Intérêt d'un modèle intégratif <i>in vivo</i> pour l'étude de la pigmentation UV-induite	186
5> Rôle de la nouvelle forme d'USF-1 dans le mélanome	186
Annexes	189
Séquence des régions promotrices de POMC et de MC1R	191
Promoteur de POMC	191
Promoteur de MC1R	192
Publications et formations	193
Liste des publications	195
Communications et formations	195
Références Bibliographiques	197

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 :	Structure de la peau	Page 28
Figure 2 :	Structure de l'épiderme	Page 28
Figure 3 :	Spectre de la lumière	Page 30
Figure 4 :	Indice UV dans le monde	Page 30
Figure 5 :	Domages de l'ADN induits par les UV	Page 34
Figure 6 :	Synthèse de la mélanine	Page 38
Figure 7 :	Pigmentation constitutive	Page 42
Figure 8 :	Dérivés de la Pro-Opio-Mélanocortine	Page 42
Figure 9 :	Structure de MC1R et variants associés à la couleur de la peau et au risque de mélanome	Page 44
Figure 10 :	Pigmentation dans le monde	Page 46
Figure 11 :	Association des variants de MC1R avec la couleur de la robe chez les animaux	Page 46
Figure 12 :	Voies d'activation du facteur Mitf	Page 54
Figure 13 :	Mitf : régulateur de l'expression des gènes de la pigmentation	Page 58
Figure 14 :	Migration et transfert des mélanosomes	Page 66
Figure 15 :	Incidence du mélanome en France (1999)	Page 76
Figure 16 :	Migration et différenciation des mélanocytes	Page 76
Figure 17 :	Développement et progression du mélanome	Page 80
Figure 18 :	Différents types de mélanomes	Page 82
Figure 19 :	Critères ABCDE du mélanome	Page 84
Figure 20 :	Indices de Breslow et de Clark	Page 86
Figure 21 :	Gènes de susceptibilité au mélanome	Page 92
Figure 22 :	Structure de la protéine USF-1	Page 110
Figure 23 :	Pigmentation photo-induite par USF-1	Page 132
Figure 24 :	Simulateur solaire	Page 146

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les facteurs influençant la pigmentation constitutive	Page 62
Tableau 2:	Les gènes de la pigmentation	Page 70
Tableau 3 :	Les gènes de susceptibilité au mélanome	Page 100

Abbréviations

α-MSH : alpha-Melanocyte Stimulating Hormone	DHICA : 5,6 DiHydroxyIndole-2-Carboxylic Acid
(6-4) PP : pyrimidone 6-4 pyrimidine	DOPA : DiHydroxyPhénylAlanine
6BH₄ : 6R 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine	DSH : Dishevelled
8-oxo-dG : 7,8 dihydro-8-oxodésoxyGuanosine	E₂ : β -Oestradiole
AC : Adénylate Cyclase	ERK : Extracellular signal Regulated Kinase
ACTH : Adreno Cortico Trophic Hormone	EDN1, 3 : Endothelin-1, 3
AD : Activation Domain	EDNRB : EDN receptor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	FGF2 : Fibroblaste Growth Factor (basic)
AIM-1 : Antigen In Melanoma	FZD : Frizzled
AIM1 : Absent in Melanoma	GGR : Global Genome Repair
AKT : Alpha RAC serine/threonine-protein kinase	Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique	GS : Griscelli Syndrome
ARF : Alternate Reading Frame	GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	HLH : Helix Loop Helix
ASIP : Agouti Signal Protein	HSP : Hermansky Puldak Syndrome
ATP : Adénosine TriPhosphate	IL-1 : Interleukine 1
Bax : Bcl2-associated X protein	INK4 : INhibitor of cyclin dependent Kinase 4
Bcl2 : B-cell lymphoma protein 2	IR : Infra Rouge
BER : Base Excision Repair	kb : kilobase
β-LPH : Lipotropin β	kDa : kiloDalton
Braf : v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1	LEF1 : lymphoid enhancer-binding factor 1
CBP : CRE Binding Protein	LYST : LYSosomal Trafficking regulator
Cdc2 : Cell division cycle 2	LZ : Leucine Zipper
Cdk : Cyclin dependant kinase	MAP : Mitogen Activated Protein
CDKN2A : CDK iNhibitor 2 A	MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
CGH : Comparative Genomic Hybridization	MATP : Membrane Associated Transporter Protein
CHIP : Chomatin ImmunoPrecipitation	MC1R : MelanoCortin Receptor 1
CPD : Cyclobutane Pyrimidine Dimer	MDM2 : Mouse Double Minute 2
CRE : Calcium Responsive Element	MEK : MAP ERK kinase
CREB : CRE Binding Protein	Mitf : Microphtalmia
CS : Cockayne Syndrome	MKK : MAP kinase kinase
DAG : DiAcylGlycerol	Mlph : Melanophilin
dbcAMP : dibutyryl cyclic adenosine monophosphate	MMS : Methyl Methane Sulfonate
Det : Dopachrome tautomérase	Myc : myelocytomatosis viral oncogene homolog
DEM : Dose Erythémale Minimale	MYO5A : MYOsine 5A
DHI : 5,6 DiHydroxyIndole	NER : Nucleotide Excision Repair
	NGF : Nerve Growth Factor
	NO : Nitric Oxide

Abbréviations

NOS : Nitric Oxide Synthase	SCC : Squamous Cell Carcinoma
N-ras : Neuroblastoma RAS oncogene homolog	SCF : Stem Cell Factor
¹O₂ : Oxygène singulet	SHC : Src homology 2 domain containing
O₂^{•-} : Anion superoxyde	SILV : human homologous of mouse silver gene
OA1 : Ocular Albinism type 1	Sox 10 : SRY (Sex determining region Y)-box 10
OCA : OculoCutaneous Albinism	SSM : Superficial Spreading Melanoma
PAH : PhenylAlanine Hydroxylase	TAF : TBP-Associated Factor
PAR-2 : Protease Activated Receptor 2	TAK1 : TGF-beta-activated kinase 1
Pax 3 : Paired box gene 3	TBP : TATAbox Binding Protein
PIC : Pre Initiation Complex	TCR : Transcription Coupled Repair
pb : paire de base	TGFβ1 : Transforming Growth Factor β1
PBT : Piebaldisme	TFIID : Transcription Factor II D
PCR : Polymerase Chain Reaction	TRP-1, 2 : Tyrosinase Related Protein 1,2
PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Kinase	TTD : TrichoThioDystrophie
PK (A,B,C, G) : Protein Kinase (A, B, C, G)	Tyr : Tyrosinase
POMC : Pro Opio Melano Cortine	USF-1, 2 : Upstream Stimulating Factor 1, 2
pRb : protéine du Rétinoblastome	USR : USF Specific Region
PTEN : Phosphatase and TENsine homolog	UV : Ultra Violets
RGP : Radial Growth Proliferation	VGP : Vertical Growth Proliferation
ROS : Radical Oxygen Species	WAF1 : Wildtype p53-Activated Fragment 1
RSK : Ribosomal S6 Kinase	WNT1 : Wingless-type MMTV integration site family, member 1
pTpT : dimères de thymidine	WS : Waardenburg Syndrome
Rab 27a : Ras related protein 27a	XP : Xeroderma Pigmentosum
RT-PCR : Reverse-Transcription PCR	

Thématique de recherche

La peau constitue la barrière la plus efficace de l'organisme contre les facteurs environnementaux, avec principalement les rayonnements ultraviolets qui sont responsables de dommages de l'ADN, des cellules constitutrices de l'épiderme et du derme. Les dommages, non correctement réparés, peuvent participer à l'apparition de cancers cutanés. Parmi ces cancers, le mélanome constitue un problème de santé publique majeur de part son issue fatale et l'apparition de plus en plus fréquente de nouveaux cas. L'augmentation de la prévalence des mélanomes est vraisemblablement liée aux nombreux comportements sociologiques d'exposition solaire.

Le principal mécanisme de protection de la peau est la pigmentation liée à la synthèse du pigment photoprotecteur : la mélanine au niveau de l'épiderme. Il existe en fait deux types de pigment : la phéomélanine et l'eumélanine qui sont synthétisés par les mélanocytes au niveau de la couche basale de l'épiderme avant d'être transférés à l'ensemble des kératinocytes avoisinants, pour une protection globale de la peau. Seule l'eumélanine est le pigment photoprotecteur. Les deux pigments sont synthétisés selon deux voies distinctes mais à partir d'un précurseur commun la tyrosine. Le contrôle précis de la balance de synthèse de la phéo et de l'eumélanine est essentiel pour la pigmentation et la protection de la peau.

Les différences phénotypiques existant entre les différents individus et espèces en terme de pigmentation de la peau ou de la robe, ne peuvent pas simplement être expliquées au niveau de la chimie du pigment. En effet, le contrôle de la synthèse de la mélanine fait intervenir un ensemble de facteurs, voies cellulaires et mécanismes de régulation qui conduisent à la régulation précise de la pigmentation. Dans notre étude nous nous intéressons particulièrement à l'ensemble des mécanismes de régulation génétique de la pigmentation, qui sont essentiels pour la synthèse de la mélanine mais également qui permettent d'expliquer les nombreuses différences phénotypiques. Il est possible de distinguer deux voies distinctes de pigmentation : la pigmentation constitutive, qui définit la couleur de la peau et conditionne la capacité de protection contre les rayonnements UV ; et la pigmentation photo-induite qui correspond à un mode de protection supplémentaire vis-à-vis des UV, en favorisant de manière importante et efficace la synthèse et le transfert de la mélanine. La connaissance des mécanismes de régulation de ces deux voies de la pigmentation est donc essentielle pour la compréhension de la protection de la peau.

Dans la première partie du manuscrit, l'étude bibliographique a pour objectif de regrouper l'ensemble des mécanismes de régulation génétique de la pigmentation constitutive avec le rôle primordial du facteur de transcription Mitf. Il nous a paru également important de définir les facteurs qui interviennent dans le dérèglement des processus normaux des mélanocytes, aboutissant aux mécanismes de cancérisation cutanée.

La deuxième partie du manuscrit correspond aux résultats des différents travaux réalisés au cours de ma thèse, qui s'articule autour du rôle du facteur de transcription USF-1 que nous avons pu impliquer dans la régulation de la pigmentation UV-induite. USF-1, de la famille des "Upstream Stimulating Factor", joue un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires en régulant l'expression des gènes impliqués dans différents processus cellulaires. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce facteur de transcription, qui est activé par les UV après stimulation de la voie de réponse au stress de la kinase p38, pour le rôle primordial qu'il occupe au niveau de la transcription. Le premier article présenté constitue une revue détaillée sur les facteurs de la famille des Upstream Stimulating Factor, et a pour objectif de décrire la structure, le mode d'action ainsi que les différentes cibles génétiques des facteurs de transcription USF afin de mieux caractériser leur rôle respectif dans la régulation des processus cellulaires (Corre and Galibert 2005). Le second article s'intéresse au rôle du facteur de transcription USF-1 dans la régulation des gènes clés de la pigmentation *POMC* et *MC1R* en réponse aux UV. Nous avons en effet pu impliquer par différentes expériences ce facteur de transcription dans la régulation UV-dépendante de l'expression des deux gènes, après fixation au niveau de motifs consensus boîte E (CANNTG) des promoteurs respectifs (Corre, Primot et al. 2004). Le troisième article décrit un nouvel outil pour l'étude *in vivo* de la réponse pigmentaire en réponse aux UV. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer les précédents résultats et donc de valider l'intérêt de notre modèle pour l'étude de la pigmentation mais également pour l'étude d'autres processus cellulaires ou pour tester l'effet de substances pharmacologiques (Corre, et al. 2005, JID soumis). La dernière partie de la thèse constitue une étape initiale d'une étude plus approfondie concernant le facteur de transcription USF-1. En effet, il s'agit de l'identification d'une nouvelle forme post-traductionnelle d'USF-1 qui apparaît de manière dépendante d'un stress intra-cellulaire et qui semble être associée à une activité variable du facteur. La caractérisation précise de cette nouvelle forme en terme de modification mais surtout du point de vue fonctionnel devrait permettre d'attribuer de nouvelles fonctions au facteur de transcription USF-1 dans des

processus cellulaires plus généraux que la pigmentation photo-induite (Corre, et al. 2005, en préparation).

L'étude des mécanismes de régulation de l'expression des gènes de la pigmentation en réponse aux UV, englobe au final un large champ d'activité de recherche. En effet, il nécessite d'une part la connaissance précise de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la pigmentation, aussi bien du point de vue chimique que du point de vue moléculaire. Il nécessite aussi la connaissance des mécanismes de dérèglement de l'activité constitutive des mélanocytes aboutissant au phénomène de cancérisation cutanée. D'autre part, l'identification d'un mécanisme de régulation transcriptionnel implique la maîtrise des différentes techniques de biologie moléculaire classique ainsi que de la culture des modèles de lignées cellulaires. L'utilisation d'un modèle *in vivo* dans notre étude, a également permis d'impliquer notre projet dans un protocole clinique impliquant les services de Dermatologie et de Chirurgie du CHU de Rennes, ainsi qu'une société privée. Ceci a permis la connaissance des contraintes logistiques et administratives liées à ce type d'étude. De plus, la caractérisation des mécanismes de régulation de la pigmentation constitutive ou photo-induite, intéresse tout particulièrement les entreprises de Dermo-cosmétologie, qui sont constamment à la recherche de molécules ayant des effets sur la pigmentation. Dans ce cadre, nous avons pu participer en collaboration avec certaines entreprises privées, à la caractérisation fonctionnelle de certaines molécules. Enfin, la connaissance précise des différents gènes et facteurs impliqués dans la pigmentation de la peau chez l'homme, nous a également permis de participer à un projet d'étude chez le chien pour l'identification des gènes responsables de la robe merle.

1> La peau

La peau est un organe complexe constitué de l'association de tissus d'origine différente à l'interface entre l'environnement et le monde du vivant (*Figure 1*). La peau est indispensable à la vie et joue un triple rôle :

Elle est la première défense de l'organisme contre le monde extérieur, le protégeant contre les agressions physiques, chimiques ou biologiques.

Elle participe à la régulation de la température corporelle par son pouvoir isolant. La sudation et la dilatation ou la contraction de ses vaisseaux en fonction de la température extérieure aident au maintien d'une température corporelle constante.

Enfin, sous l'action des rayons ultra-violet, la provitamine D, présente dans l'épiderme, est transformée en vitamine D, qui est véhiculée dans l'organisme participant ainsi à la formation osseuse.

Cette interface protectrice pèse environ 4 kilos et mesure entre 0,5 et 4 mm de profondeur (de 0,5 mm à 2 mm à la paume des mains et de 3 mm à la plante des pieds) pour une surface moyenne de 1,70 m² à l'âge adulte. La peau, composée de 2000 milliards de cellules, est constituée d'un épithélium de revêtement : l'épiderme (couche externe avec annexes), d'un tissu conjonctif : le derme (couche épaisse), et d'un tissu adipeux : l'hypoderme.

1.1> L'épiderme

L'épiderme (*Figure 1*) ou couche superficielle recouvre le derme et reproduit la surface de la peau avec ses saillies, ses dépressions et ses orifices. Il dérive de l'ectoderme. C'est un épithélium pavimenteux, stratifié kératinisé (cinq couches) fabriqué en permanence par la couche basale. La kératinisation est la transformation cornée de l'enveloppe des cellules et des fibrilles épidermiques; elle aboutit à la desquamation (détachement de la couche épidermique superficielle par petits lambeaux ou squames) ou à une augmentation d'épaisseur sous l'action de traumatismes répétés (callosités). C'est à la jonction derme-épiderme (couche basale) que se trouvent les mélanocytes (élaboration de la mélanine). L'épiderme, riche en terminaisons nerveuses, est un épithélium de revêtement qui se renouvelle environ une fois par mois grâce à ses cellules souches et à la kératinisation. Quatre catégories cellulaires composent principalement l'épiderme : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans, et les cellules de Merkel.

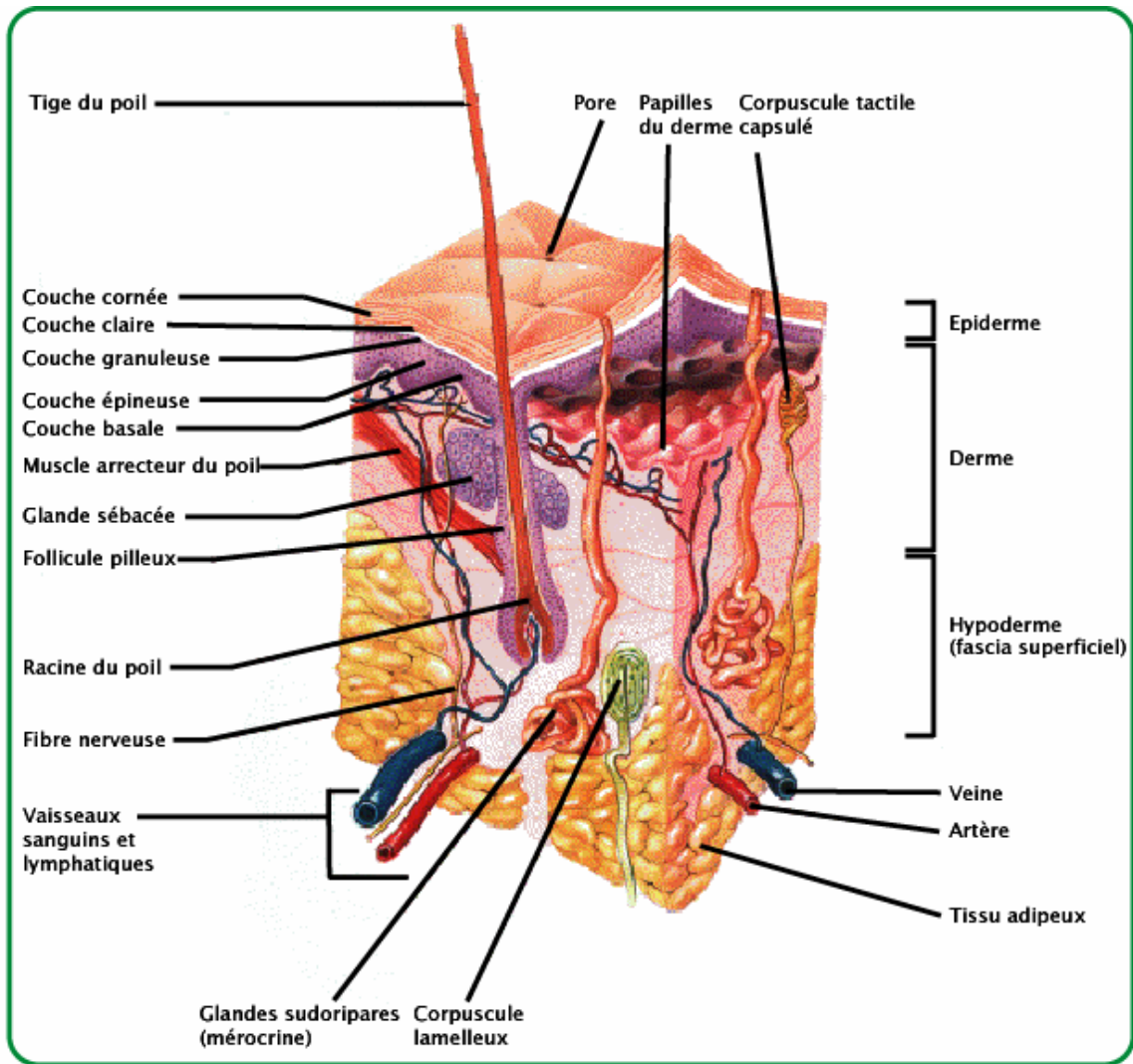


Figure 1: Structure de la peau

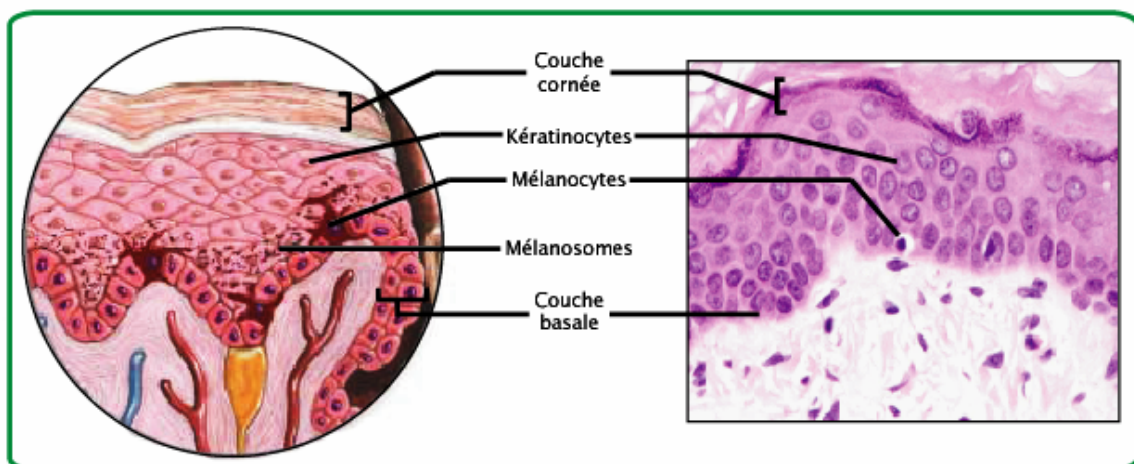


Figure 2: Structure de l'épiderme

1.1.1> Les kératinocytes

Les kératinocytes (*Figure 2*) sont les cellules majoritaires de l'épiderme (80% des cellules) impliquées dans la production de la kératine (environ une vingtaine chez l'homme), protéine constitutive de la couche cornée, la plus résistante et la plus extérieure. La kératine molle au niveau de l'épiderme se distingue de la kératine dure des phanères. La kératinisation est un processus continu au cours de la maturation cellulaire. Les kératinocytes subissent ainsi une évolution morphologique permanente de la profondeur vers la superficie de l'épiderme, en quatre couches superposées : la couche germinative (ou basale), la couche à épines (ou épineuse), la couche granuleuse et la couche cornée (compacte, puis desquamante). Les cellules vont progressivement s'aplatir et s'épaissir pour finalement se transformer en cornéocytes, qui vont desquamer au niveau de la couche cornée.

1.1.2> Les mélanocytes

Les mélanocytes (10 à 15% des cellules épidermiques) (*Figure 2*), dérivent de cellules totipotentes de la crête neurale et migrent lors du 2^{ème} et 3^{ème} mois de vie embryonnaire (Larue, Kumasaka et al. 2003). Les mélanocytes se situent principalement au niveau de la couche basale de l'épiderme et sont entourés de kératinocytes (1 pour 40). Ces cellules à l'aspect étoilé, présentent des prolongements cytoplasmiques (dendrites) qui s'insinuent entre les kératinocytes.

Le nombre de mélanocytes varie selon la localisation des régions cutanées. Ainsi, les mélanocytes sont presque absents des paumes, plantes, muqueuses et au niveau de la peau du cuir chevelu, une centaine au mm², et très nombreux par contre dans la papille des poils et des cheveux et sur les régions découvertes avec une densité variant de 2000/mm² pour la peau de la face et de 1000/mm² pour celle du corps. Par contre, leur nombre est sensiblement identique dans toutes les populations humaines (caucasiennes, négroïdes et asiatiques), la différence de couleur s'expliquant par la qualité et la quantité de pigments que ces cellules produisent.

Les mélanocytes sont en effet le lieu de synthèse de la mélanine qui colore la peau et les cheveux. Deux types de pigments sont synthétisés au niveau de vésicules spécifiques (les mélanosomes) : la phéomélanine (orange) et l'eumélanine (noire) ; permettant d'expliquer la diversité de couleurs de la peau. Le transfert du pigment aux kératinocytes permet la protection de la peau face aux rayonnements UV.

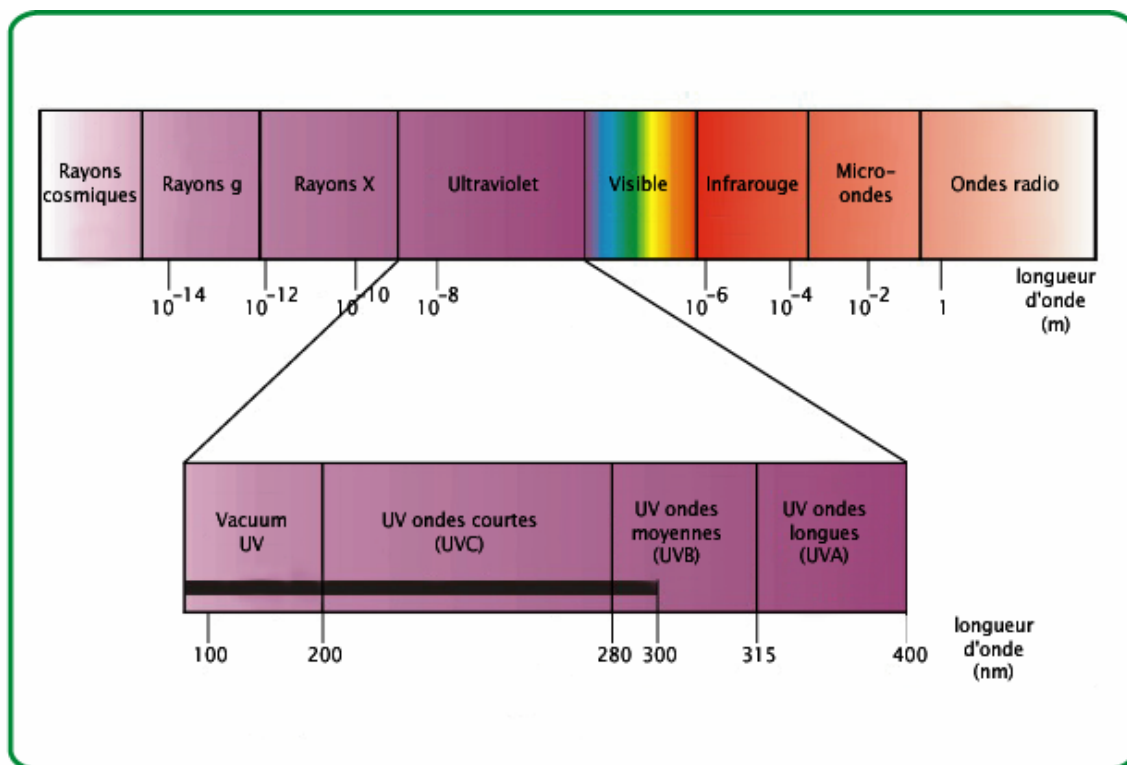


Figure 3: Spectre de la lumière

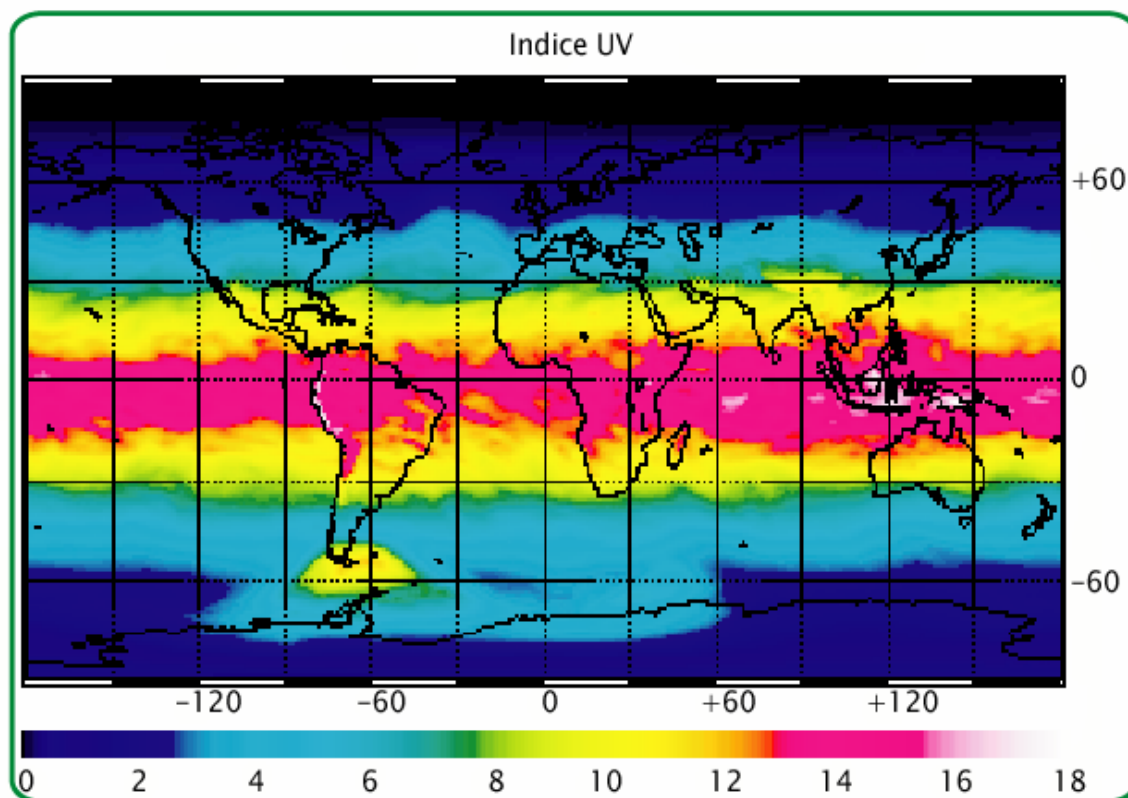


Figure 4: Indice UV dans le monde

1.1.3> Les cellules de Langherans

Les cellules de Langherans (3 à 8% des cellules de l'épiderme) dérivent des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse et sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères. Elles sont dispersées entre les kératinocytes de la couche à épines de l'épiderme. Les cellules de Langherans sont des cellules dendritiques, piliers des défenses immunitaires de la peau et des muqueuses. Elles participent aux défenses anti-microbiennes et anti-cancéreuses, initiant et propageant les réponses immunitaires, par leur capacité de phagocytose et leur rôle de cellule présentatrice d'antigènes aux lymphocytes T.

1.1.4> Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel (moins de 1% des cellules de l'épiderme) sont des récepteurs de la peau et des annexes cutanées (les phanères), qui sont sensibles à la pression. Les cellules de Merkel, situées de façon dispersée au niveau de la couche germinative, sont des cellules neuroendocrines qui expriment des marqueurs neuronaux (chromogranine, synaptophysine, nombreux neuropeptides) et des marqueurs épithéliaux (nombreuses kératines). Ces récepteurs ont également des fonctions inductives et trophiques sur les terminaisons nerveuses de l'épiderme et sur les annexes cutanées.

1.2> Le derme

D'une épaisseur de 2 mm en moyenne mais pouvant aller de 0,6 mm à 3 mm, le derme est un tissu conjonctif dense et irrégulier qui correspond à la couche la plus épaisse de la peau et qui détermine sa structure générale (*Figure 1*). Il permet le développement des couches supérieures, de la vascularisation et de l'innervation. Il assure en outre le soutien et la nutrition de l'épiderme. Le derme est formé de collagène I (80%) et III (20%) ainsi que d'élastine responsable de la résistance et de l'élasticité de la peau. Le derme est composé d'éléments cellulaires distincts : fibroblastes, macrophages, lymphocytes, mastocytes et cellules adipeuses, et est constitué de deux zones. La zone papillaire en surface qui contient beaucoup de cellules et de capillaires mais assez peu de fibres (tissu conjonctif lâche). Tandis que la zone réticulaire, profonde, contient peu de cellules mais beaucoup de fibres (tissu conjonctif dense) ainsi que des tissus musculaires (muscles arrecteurs, le visage).

1.3> L'hypoderme

L'hypoderme constitue la couche la plus profonde de la peau (résistance mécanique et mobilité par rapport au plan inférieur) (*Figure 1*). Il est richement vascularisé, possède les terminaisons nerveuses, la partie inférieure des follicules pileux et les glandes sudoripares. Dans sa constitution la plus complète, l'hypoderme comprend trois couches superposées : le tissu adipeux est divisé en lobules par des travées conjonctives qui s'insèrent à la face profonde du derme; la fascia superficialis ou toile sous-cutanée, et le tissu celluleux sous-cutané. C'est dans cette couche que cheminent les rameaux vasculaires et nerveux.

2> L'influence des rayonnements UV

Les rayonnements solaires ultraviolets (UV) constituent un facteur de risque important dans le développement des mélanomes. Ils sont responsables de différents dommages au niveau des cellules constitutives de l'épiderme et du derme, pouvant aboutir au processus de cancérisation cutanée.

Les sources de rayonnements ultraviolets sont de différents types. Il peut s'agir de sources artificielles avec les cabines d'exposition UV, mais la principale source d'UV provient du rayonnement solaire.

Dans ce chapitre, nous développerons dans un premier temps les caractéristiques des rayonnements ultraviolets, puis dans un second temps nous nous intéresserons uniquement à l'influence des UV au niveau de la peau, sans occulter l'effet des autres rayonnements sur la réponse cutanée.

Le rayonnement UV solaire, ne représente que 5% de la lumière terrestre, et ne constitue qu'une petite partie du spectre électromagnétique (Kitano and Hu 1969; Diffey 2002) (*Figure 3*). Les autres régions du spectre incluent les ondes radio, les micro-ondes, les radiations infrarouges (800 nm à 500 μ m) (responsables du réchauffement), la lumière visible (400 à 800 nm), les rayons X et les rayons γ . Les rayons UV sont des radiations non ionisantes dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 100 et 400 nm. Les effets biologiques des rayons UV sont très variables en fonction de la longueur d'onde. Il existe en effet quatre régions distinctes des UV : les Vacuum-UV (100 à 200 nm), les UVC (200 à 290 nm), les UVB (290 à 320 nm) et les UVA (320 à 400 nm). Seuls les UVA et -B atteignent la surface de la Terre, les autres rayonnements sont en effet filtrés au niveau de la couche d'ozone qui retient presque tous les rayonnements dont la longueur d'onde est inférieur à 290

nm (Rouzaud, Kadarko et al. 2005). Les UV atteignant la peau peuvent suivre une des trois voies suivantes : la réflexion, la diffusion ou l'absorption. La réflexion apparaît principalement au niveau de la couche cornée de l'épiderme mais également dans les différentes couches qui ont des index variables de réfraction. La diffusion est due à la diversité des éléments structuraux constituant la peau. Le reste des UV ne subissant ni l'effet de réflexion ou de diffusion sont absorbés par les différentes couches cellulaires de la peau. En fonction de la latitude, le niveau d'UV qui atteint la surface de la peau varie considérablement, ce qui permet d'établir des indices UV en fonction de la zone géographique (*Figure 4*). Des études ont pu montrer, que le système pigmentaire avait évolué différemment selon les doses de rayonnements solaires atteignant la Terre. Cette protection est globalement plus efficace pour les hommes que pour les femmes (Jablonski and Chaplin 2000). L'effet des UV va varier en fonction de la pénétrance des rayonnements, qui dépend de la longueur d'onde des UV et de l'épaisseur de la couche cornée et de l'épiderme. Il est clairement établi que les rayonnements UV sont responsables de dommages de l'ADN avec l'apparition de CPD de (6-4) PP sous l'effet des UVB et UVC ou de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine sous l'effet d'UVA et d'UVB (*Figure 5*). Ces dommages vont être à l'origine des mécanismes de cancérisation cutanée associés aux kératinocytes ou aux mélanocytes (Young, Potten et al. 1998; Cadet, Sage et al. 2005; Pfeifer, You et al. 2005).

2.1> Les Vacuum-UV

Les Vacuum-UV n'atteignent pas la surface de la Terre et ne sont donc pas responsables de déclenchement de processus cutanés et de dommages au niveau cellulaire. Cependant, une étude a pu montrer *in vitro* que ce type de rayonnement très énergétique pouvait être à l'origine de cassures au niveau de l'ADN ainsi que de modifications de bases chez la bactérie *Bacillus subtilis* (Ito 1992). Les Vacuum-UV ont donc potentiellement un rôle mutagène au niveau des cellules de la peau.

2.2> Les UVA

Les UVA (95% des UV) sont faiblement énergétiques, ils atteignent les couches profondes de la peau et sont en partie associés au vieillissement cutané. Ils sont responsables de dommages au niveau cellulaire et peuvent être à l'origine de mécanismes de cancérisation cutanée (Tyrrell 1984; Matsui and DeLeo 1991).

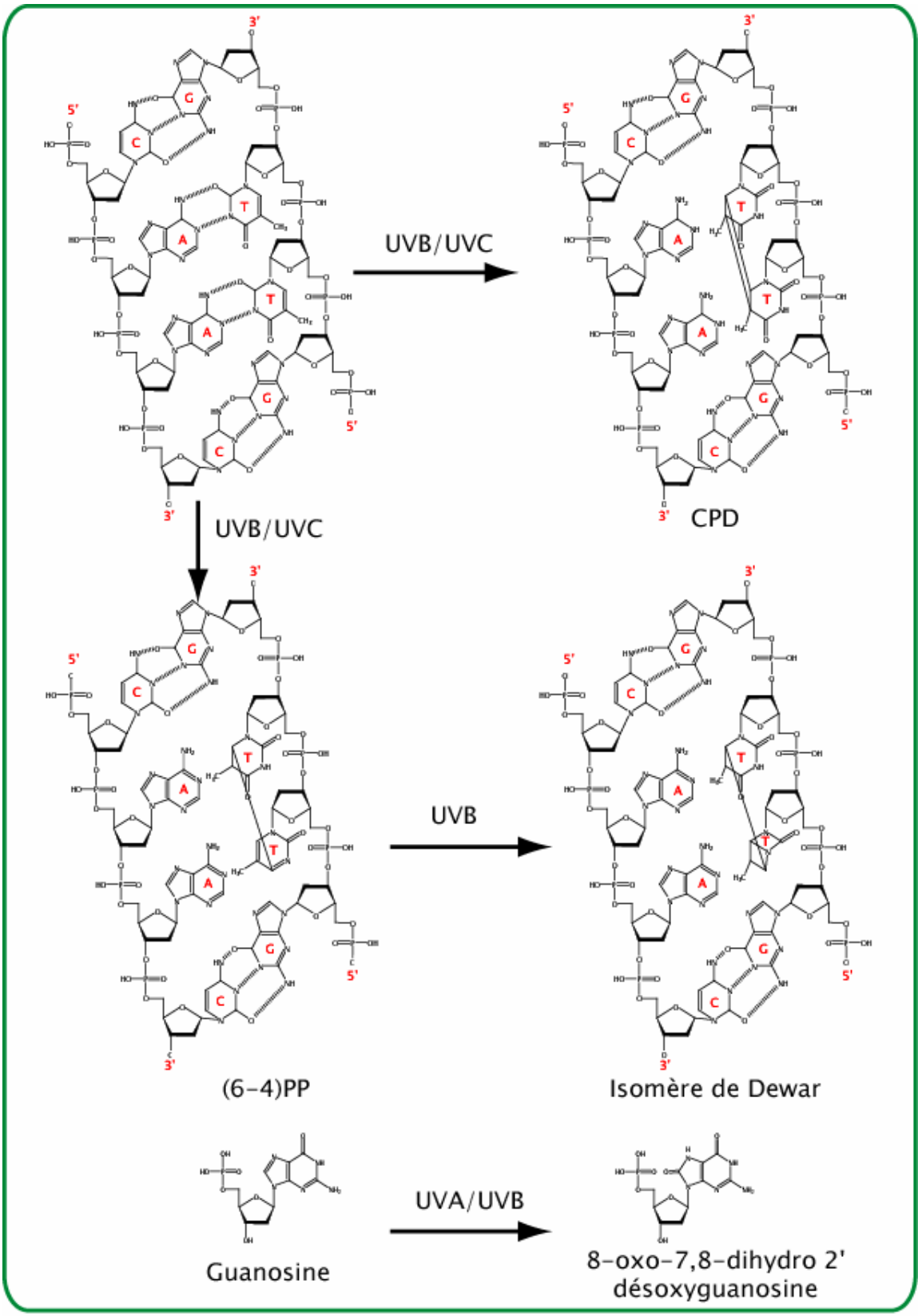


Figure 5: Dommages de l'ADN induits par les UV

Ils ne sont que très faiblement absorbés par l'ADN et leurs effets génotoxiques sont indirects. Les modifications de l'ADN sont des cassures à l'intérieur d'un simple brin, des pontages ADN-protéines, et des 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine. L'apparition de 8-oxodG est la conséquence de la présence exagérée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à l'absorption de photons par des molécules photosensibilisantes endogènes (riboflavine, porphyrines, quinones, bilirubine), qui réagissent directement avec un substrat (réaction de type I qui implique un transfert d'électron) ou l'apparition d'anion superoxyde (O_2°) et de l'oxygène singulet (1O_2) (réaction de type II) (*Figure 5*) (Kielbassa, Roza et al. 1997; Kvam and Tyrrell 1997; Ahmed, Ueda et al. 1999; Douki, Perdiz et al. 1999). L'oxygène singulet entraîne des dommages au niveau des guanines, alors que l'anion superoxyde va être transformé en H_2O_2 par les superoxides dismutases et va indirectement conduire à des lésions de bases sous forme de radical hydroxyle $^{\circ}OH$. La présence de 8-oxodG prédispose aux transitions GC en TA et pourrait donc jouer un rôle dans la carcinogénèse cutanée.

2.3> Les UVB

Les UVB (5% des UV) sont les rayonnements UV les plus énergétiques qui atteignent la surface de la Terre. La majorité des UVB sont absorbés au niveau de la couche cornée. Ainsi seul 10% d'UVB touche la couche basale, et sont alors à l'origine de nombreux processus cellulaires. En effet, les UVB sont responsables de la pigmentation photo-induite, mais vont également déclencher l'érythème, qui correspond à une réaction inflammatoire immédiate suite à l'exposition solaire. Ils interviennent également dans la prolifération des cellules souches de l'épiderme pour le renouvellement des kératinocytes.

Les UVB sont également à l'origine de nombreux dommages au niveau de l'ADN des cellules constitutives de l'épiderme. Les kératinocytes, sont des cellules très sensibles à ces dégâts et vont rapidement entrer dans un processus d'apoptose. Par contre, les mélanocytes qui sont beaucoup plus résistants peuvent dégénérer et proliférer pouvant aboutir à l'apparition d'un mélanome. Des expériences d'irradiation de souris transgéniques à l'aide de sources de longueurs d'ondes précises ont permis de montrer que seuls les UVB, contrairement aux UVA, sont à l'origine de ce type de cancers cutanés. (De Fabo, Noonan et al. 2004). Les UVB ont pour cibles principales les bases pyrimidines, aboutissant à la formation de différents photoproduits impliquant la présence adjacente de deux bases pyrimidines (Pfeifer, You et al. 2005) :

Les dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) (75%) sont responsables de 80% des mutations induites par les UVB dans les cellules de mammifères (You, Lee et al. 2001) et

tiennent une importance majeure dans la carcinogenèse cutanée du fait de leur abondance (20 à 40 fois plus que les autres dommages de l'ADN) (Pfeifer, You et al. 2005), et de leur lente réparation (*Figure 5*). Les dimères de pyrimidines CPD contenant des 5-méthylcytosine constituent des sites préférentiels de mutation dans les cellules (ex : p53).

La présence de photoproduits pyrimidine 6-4 pyrimidine ((6-4) PP) (*Figure 5*) (Freeman, Hacham et al. 1989) au sein de motifs de liaison consensus pour certains facteurs de transcription peut s'avérer critique pour la fixation diminuant leur activité transcriptionnelle (Tommasi, Swiderski et al. 1996).

Les isomères de Dewar proviennent de la conversion des (6-4) PP sous l'effet d'une photoisomérisation à 320 nm (UVB) (*Figure 5*). Bien que moins bien étudiés que les CPD et les (6-4) PP, les isomères de Dewar semblent également jouer un rôle dans la carcinogenèse et mutagenèse cutanées, du fait de leur fréquence d'apparition et de leur lente élimination comparable à celle des CPD (Perdiz, Grof et al. 2000).

Les UVB vont enfin être à l'origine d'oxydations secondaires des guanines *via* l'apparition de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (Ahmed, Ueda et al. 1999).

2.4> Les UVC

Les UVC sont les plus énergétiques. Ils n'atteignent que très rarement la surface de la Terre dans certaines zones de la planète présentant des trous de la couche d'ozone (ex : Australie, Amérique du sud). Cependant, ils présentent un intérêt puisqu'ils sont très souvent utilisés en laboratoire pour l'étude des réponses aux UV, du fait de leur grande énergie. Ils sont responsables des mêmes types de dommages de l'ADN que les UVB, mais ne produisent pas d'isomères de Dewar.

Les rayonnements ultraviolets peuvent parfois induire des anomalies chromosomiques (recombinaisons) plus importantes que des mutations ponctuelles, au cours de la réplication de l'ADN. De tels remaniements ont ainsi été décrits chez la bactérie *Micrococcus luteus*, et sont envisageables chez les mammifères malgré un temps de génération beaucoup plus long (Fornace 1983). Enfin, les protéines sont les cibles privilégiées de la photo-oxydation cellulaire du fait de leur grande abondance, de la présence de chromophores endogènes au niveau des protéines de structures (ex : hème, flavine...) et de leur capacité à réagir avec d'autres molécules oxydantes. La photo-oxydation des protéines implique deux processus. Le premier est une photo-oxydation directe des protéines après absorption de radiations UV (réaction de type I). Le second processus implique une oxydation indirecte *via* la formation

d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui vont réagir avec certains acides aminés (histidine, méthionine...) (réaction de type II) (Davies and Truscott 2001). La conséquence de la photo-oxydation des protéines peut conduire à la perte de l'activité protéique par modification de la structure secondaire ou tertiaire, la fragmentation de la chaîne d'acides aminés, la formation d'agrégats, une affinité accrue pour les enzymes de protéolyses, une altération des propriétés physico-chimiques ; aboutissant ainsi à des désordres biologiques (ex : cataracte).

2.5> La protection et la réparation des lésions induites par les UV

Dans les cellules de mammifères, il existe plusieurs modes de réparation en fonction du type de dommages. Ainsi, les photoproduits d'ADN (6-4) PP et CPD sont éliminés par la réparation par excision de nucléotides (NER), par la réparation couplée à la transcription (TCR) ou par la réparation globale de l'ADN génomique (GGR). Une déficience de l'une des voies de la NER est responsable de trois pathologies humaines distinctes : xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS), et la trichothiodystrophie (TTD) qui sont des maladies caractérisées par d'importants désordres de la peau en réponse aux rayonnements UV. Les photo-lésions et les cassures simples brins sont elles, éliminées par la réparation par excision de bases (BER) permettant une élimination rapide de la mutation.

Pour ce qui concerne les espèces réactives de l'oxygène (ROS), elles sont éliminées par la présence de différentes enzymes (la catalase, la GSH reductase, la superoxyde dismutase, la GSH peroxydase) et vitamines (A, C, E) qui ont un pouvoir anti-oxydant. La stimulation de la mélanogénèse par utilisation des anions superoxydes (O_2^\ominus) permet une diminution de leur concentration et donc de leur effet mutagène (Valverde, Manning et al. 1996).

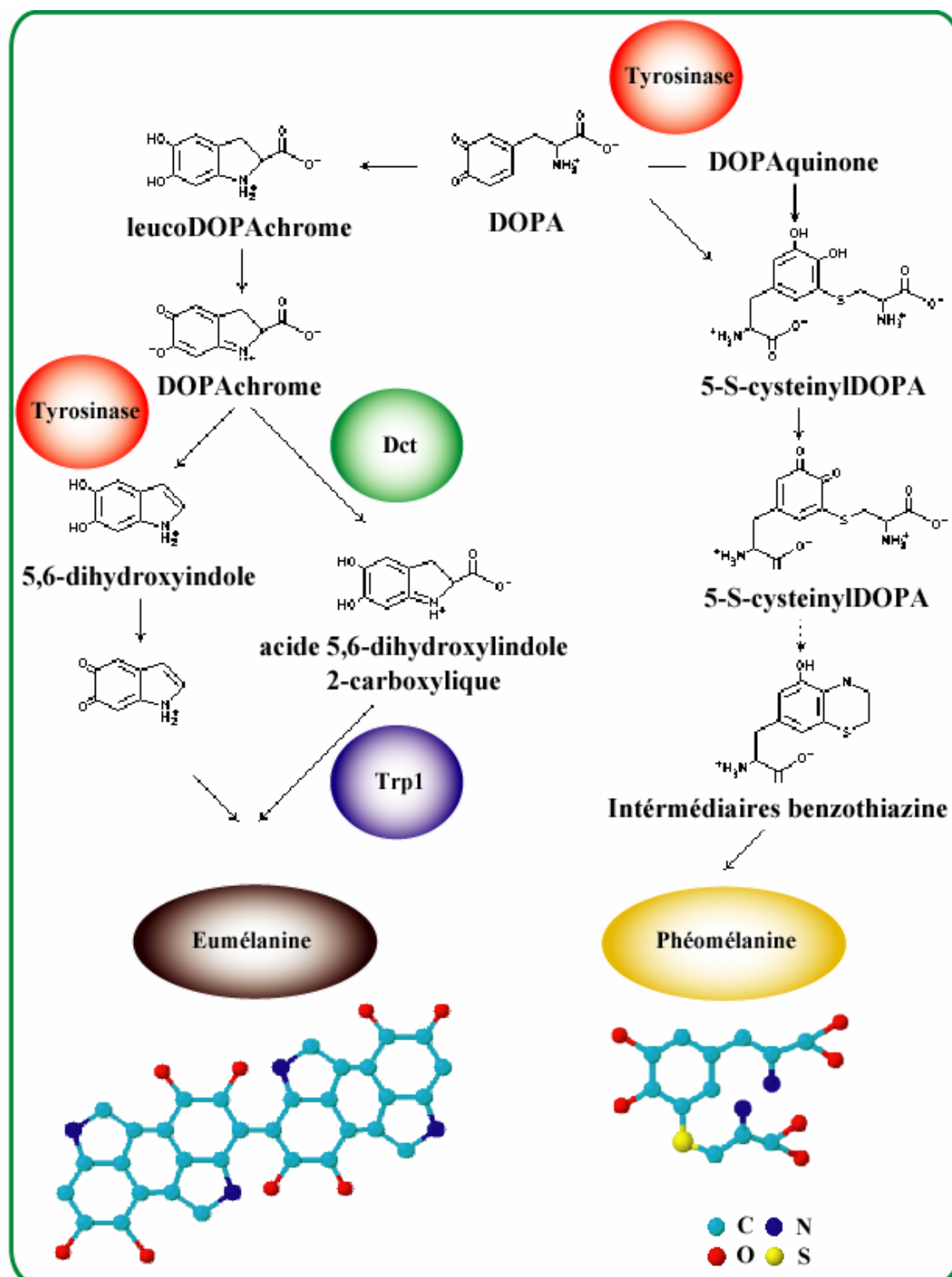


Figure 6: Synthèse de la mélanine

3> La protection de la peau

3.1> La mélanogénèse

Le mélanocyte constitue l'unique lieu de synthèse de la mélanine, qui se déroule au niveau d'organites cytoplasmiques ovoïdes (0,2 à 0,6 μm) : les mélanosomes. La mélanogénèse comprend ainsi les étapes de synthèse de la mélanine et le transfert des mélanosomes à l'ensemble des kératinocytes. Il existe deux types de pigments mélaniques, qui ont des caractéristiques photo-chimiques différentes : l'**eumélanine** qui est noir-marron et photoprotectrice (polymère indolique) et la **phéomélanine** qui est jaune orangée, cytotoxique, et non protectrice (sous unité benzothiazine) (Ou-Yang, Stamatas et al. 2004). La quantité relative entre ces deux pigments semble déterminante dans la photoprotection et varie selon le phototype. En effet, chez les individus à peau claire et cheveux roux ou blonds, la phéomélanine est majoritaire alors que chez les individus à peau foncée, l'eumélanine prédomine (Hunt, Kyne et al. 1995). Le degré de pigmentation pour un individu donné n'est pas déterminé par la densité de mélanocytes au niveau de l'épiderme, mais est lié au contrôle spécifique de la balance de synthèse de ces deux pigments (*Figure 6*). Enfin sous le terme pigmentation, il est possible de distinguer la pigmentation "**constitutive**" qui définit la couleur de peau de chaque individu de la pigmentation "**photo-induite**" qui met en jeu des mécanismes supplémentaires en réponse aux stimulations UV.

Les deux pigments sont issus d'un précurseur physiologique commun la L-tyrosine qui subit différentes étapes d'hydroxylation, d'oxydation, de cyclisation et de polymérisation pour aboutir à l'eumélanine et à la phéomélanine (*Figure 6*). L'enzyme tyrosinase, enzyme limitante de la mélanogénèse, est commune aux deux voies de synthèse, alors que la DOPAchrome tautomérase codée par le gène *DCT* ou *TRP2* et la DHICA oxidase ou TRP-1 (Tyrosinase Related protein) sont spécifiques de la production d'eumélanine (Kobayashi, Urabe et al. 1994). L'enzyme TRP-1 aurait un rôle stabilisateur de l'activité tyrosinase (Kobayashi, Imokawa et al. 1998). La concentration des différentes enzymes est un facteur essentiel dans le contrôle de la balance eumélanine/phéomélanine et donc dans la pigmentation de la peau. La mutation de ces facteurs (*TYR*, *TRP1*) est critique pour la pigmentation et conduit à l'albinisme oculaire cutané (OCA). La mutation du gène *TYR* est associée à l'albinisme oculaire cutané de type 1 (King, Pietsch et al. 2003), et la mutation de *TRP1* est associée à l'albinisme oculaire cutané de type 3.

3.2> Les rôles de la mélanine

La mélanine constitue le seul moyen efficace pour une protection des cellules de l'épiderme contre l'irradiation solaire, limitant ainsi la carcinogenèse cutanée. En effet, des études *in vivo* ont montré que la quantité de photo-produits était inversement proportionnelle à la quantité de mélanine présente dans la cellule (Kobayashi, Muramatsu et al. 1993; Kadakaro, Kavanagh et al. 2003). L'eumélanine joue son rôle photoprotecteur à différents niveaux. En tant que chromophore, elle absorbe les photons, diminuant la quantité d'UV atteignant l'épiderme (ce phénomène s'accompagne d'un dégagement de chaleur) (Smit, Vink et al. 2001). Enfin, La mélanine de manière indépendante de son type (phéo ou eumélanine) est également capable de se fixer aux espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde, oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène, radicaux...) diminuant le risque d'oxydation des guanines (Bustamante, Bredeston et al. 1993).

4> Les mécanismes de pigmentation

Le contrôle de la synthèse de la pigmentation constitutive et photo-induite, est un mécanisme complexe, impliquant l'ensemble des éléments de l'épiderme. De l'activation de voies de signalisation dépend la régulation de l'expression des différents gènes de la pigmentation. Ainsi, les quatre grandes voies, impliquées dans la régulation de la pigmentation, seront successivement abordées impliquant en amont le couple POMC/MC1R ou d'autres facteurs paracrines tels que l'endothéline (EDN1), le facteur basique des fibroblastes (FGF2) ou le facteur des cellules souches ou stem cell factor (SCF) (Figure 7).

4.1> Le rôle du couple POMC-MC1R

4.1.1> POMC

Le gène et ses dérivés

Le gène *POMC* humain (Pro-Opio-Mélano-Cortine) a été cloné et identifié par expérience de Northern blot en 1980 (Chang, Cochet et al. 1980). Les séquences codantes et intergéniques ont été successivement identifiées et le gène a pu être localisé sur le chromosome humain en position 2p23.3 (Cochet, Chang et al. 1982; Whitfeld, Seeburg et al. 1982). Celui-ci est constitué de 3 exons dont 2 codants répartis sur 4 kb (1^{er} exon non codant de 458 pb, 2^{ème} exon codant de 151 pb, et le 3^{ème} exon codant de 671 pb). L'analyse phylogénétique du gène *POMC* chez les vertébrés a permis de démontrer sa présence non seulement chez les mammifères, mais également chez les oiseaux, les amphibiens, les reptiles ou encore les poissons. Cette conservation génique et protéique a été particulièrement étudiée chez les espèces courantes de laboratoire comme, le rat (Drouin, Chamberland et al. 1985), la grenouille (Hilario, Lihmann et al. 1990), ou encore le xénope (Hansen, To et al. 2003) (~70% d'homologie entre l'homme et la souris). L'homologie est encore plus importante au niveau protéique, qui comprend quatre régions très conservées : la région N-terminale, les régions de l'ACTH, de la β -MSH, et de la β -Endorphine. Enfin, des expériences d'expression tissulaire à l'aide de constructions du gène ont permis de définir le promoteur minimal (-480 à -34) comme étant nécessaire et suffisant à l'activation spécifique de la transcription du gène (Jeannotte, Trifiro et al. 1987).

Le gène *POMC* code un polypeptide précurseur de 267 acides aminés (~30 kDa), qui est exprimé au niveau de l'hypophyse antérieure pour une action systémique, mais également de manière locale au niveau de l'épiderme avec une synthèse dans les kératinocytes et les mélanocytes.

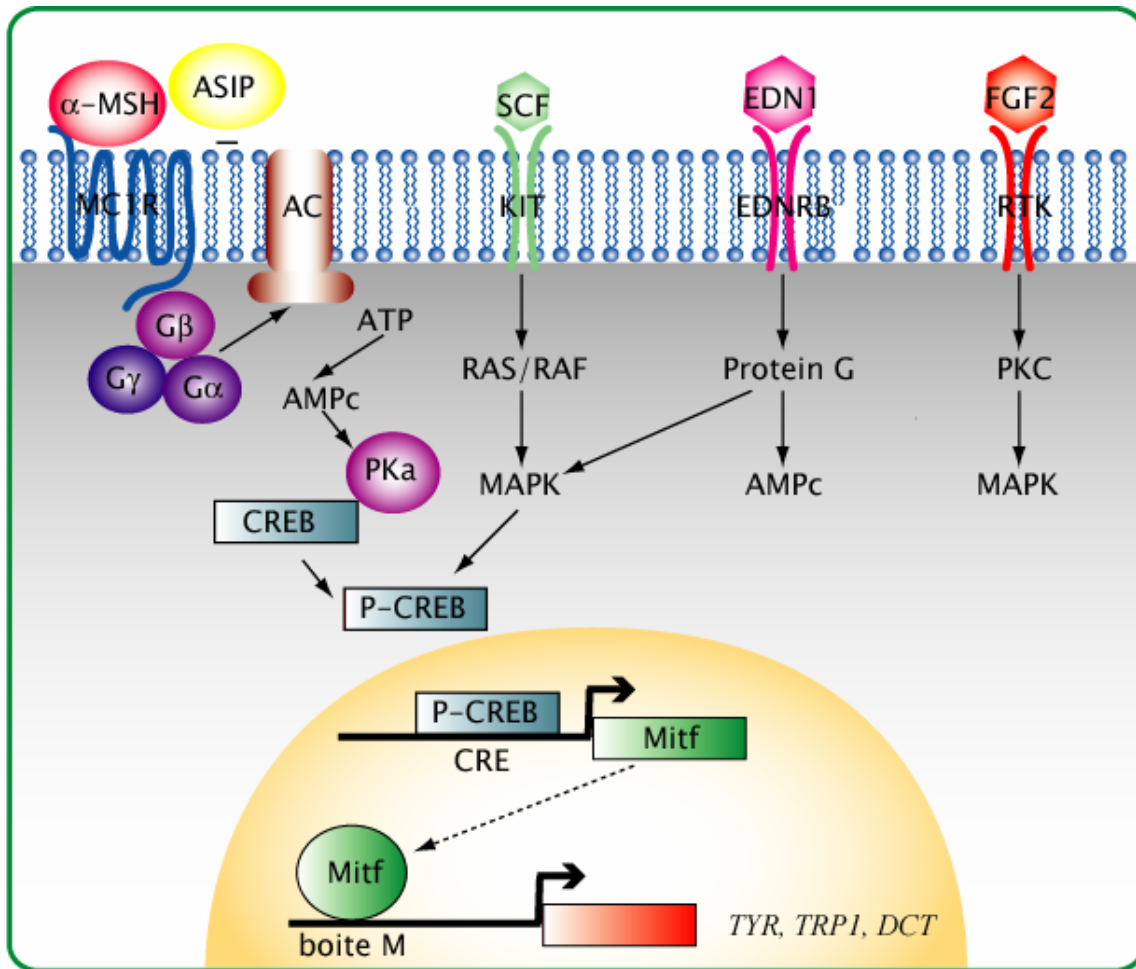


Figure 7: Pigmentation constitutive

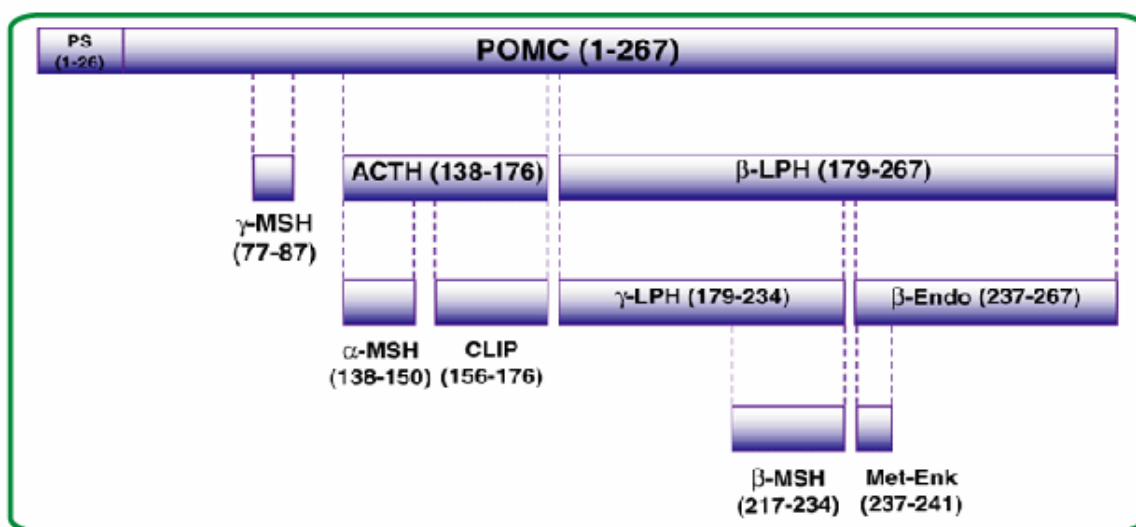


Figure 8: Dérivés de la Pro-Opiomélanocortine

Les peptides issus du clivage par les pro-convertases 1 et 2 de la POMC sont de différents types : des peptides corticotropes, mélanotropes ou opioïdes tels que l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH), la β et γ lipotropine (LPH), la β et γ -MSH (Melanocyte Stimulating Hormon), et la β endorphine (β -End) (Schauer, Trautinger et al. 1994; Wintzen and Gilchrest 1996; Hadley and Haskell-Luevano 1999) (*Figure 8*). L' α -MSH est un peptide de 12 acides aminés qui résulte du clivage de l'ACTH.

Les rôles et fonctions

Les différents peptides hypophysaires, dérivés de la Pro-Opiomélanocortine jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions chez les mammifères : la stéroïdogénèse, l'homéostasie, l'excrétion, le stress, les fonctions sexuelles, l'analgésie, la thermorégulation, l'inflammation, la régulation cardiaque, et la pigmentation (Rouzaud, Kadekaro et al. 2005). L'ACTH est un régulateur clé de la sécrétion des hormones corticostéroïdes qui sont essentielles pour la réponse au stress. Les opioïdes β -End et la Met-enképhaline jouent un rôle antalgique important au niveau du système nerveux central. Enfin, les peptides LPH et MSH sont essentiels dans les tissus périphériques pour leurs diverses activités au niveau du métabolisme des lipides, de la réaction inflammatoire... L' α -MSH est synthétisé de manière localisée par les mélanocytes et par les kératinocytes, notamment après stimulation par les UV, et intervient dans différentes fonctions de la peau telles que la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire et la pigmentation (Thody and Graham 1998). La fonction de l' α -MSH dans la pigmentation est intimement liée à la liaison du peptide à son récepteur MC1R, situé à la membrane des mélanocytes (Wakamatsu, Graham et al. 1997; Tsatmalia, Wakamatsu et al. 1999; Tsatmali, Ancans et al. 2000).

4.1.2> MC1R

L'étude du récepteur MC1R a un intérêt particulier pour la compréhension des mécanismes d'activation de la synthèse de la mélanine, mais également pour l'étude de la cancérisation cutanée du fait de l'existence de variants génétiques du gène, qui sont associés à des prédispositions variables.

Le gène

Les gènes codant pour la famille des récepteurs mélanocortine (MCR) ont été clonés en 1992 (Chhajlani and Wikberg 1992; Mountjoy, Robbins et al. 1992). Le gène *MC1R*, qui est localisé chez l'homme en 16q24.3,

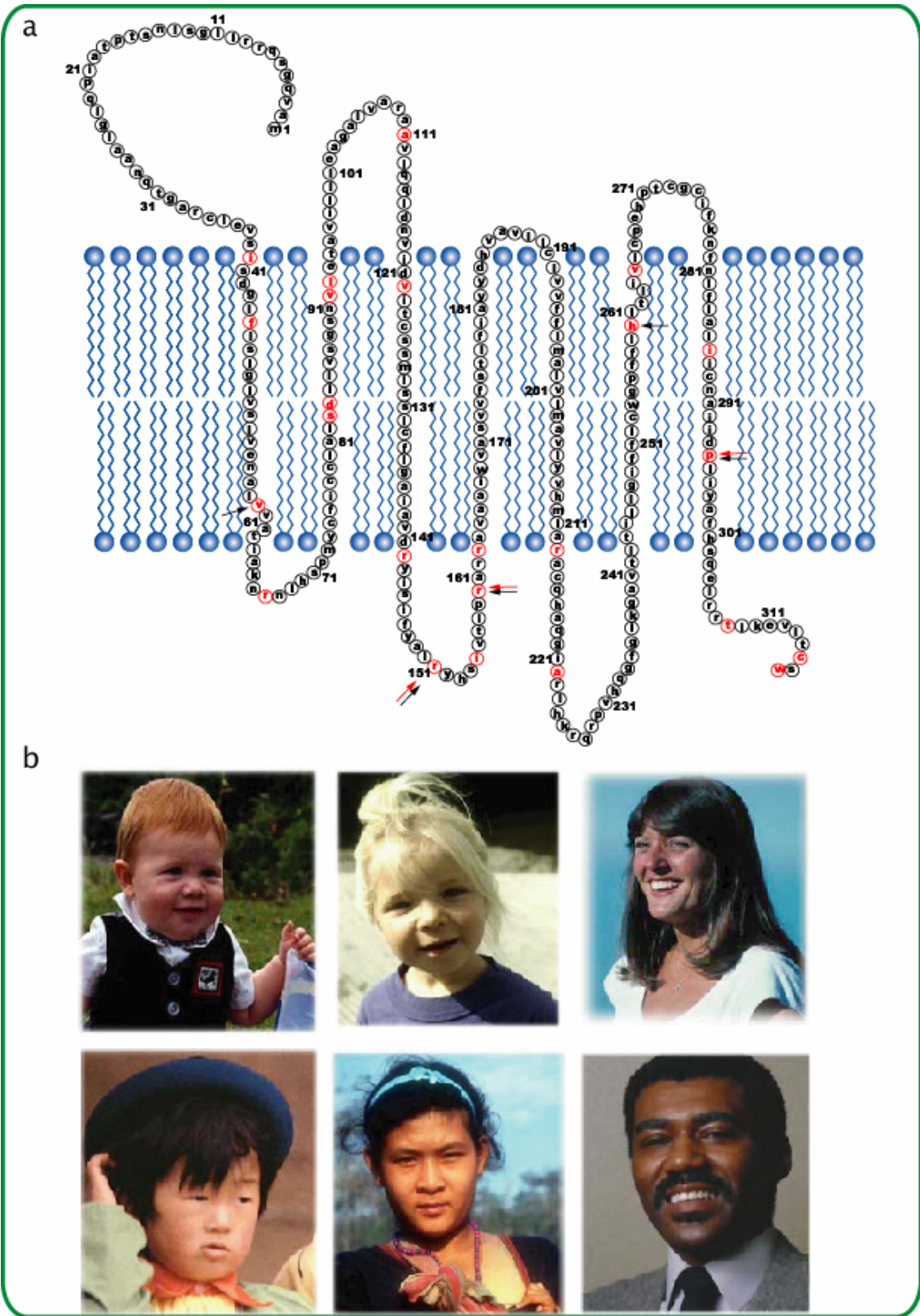


Figure 9: Structure de MC1R et variants associés à la couleur de la peau et au risque de mélanome

s'étend sur une large région de 12 kb et se constitue d'un seul exon de 954 pb. Les différentes études de séquençage réalisées sur des populations d'individus de phototype variable ont permis d'identifier un nombre important de variants du récepteur (> 65) à la fois dans la région codante du gène (Rana, Hewett-Emmett et al. 1999; Rees 2004; Wong and Rees 2005); mais également au niveau du promoteur (Makova, Ramsay et al. 2001). Malgré ce grand polymorphisme, le gène *MC1R* est très bien conservé au cours de l'évolution et est présent chez de nombreuses espèces mêmes très éloignées. De plus, les variants du gène *MC1R* ont été sélectionnés au cours de l'évolution de manière très précise selon les populations, avec une influence importante de l'environnement. Ainsi, le niveau de polymorphisme est moins important chez les populations négroïdes, où la pression de sélection associée au niveau d'exposition solaire plus importante fait que seuls les variants fonctionnels du récepteur *MC1R* ont été conservés dans ces populations. A l'inverse, dans les populations caucasiennes à peau claire, de nombreux variants du récepteur sont retrouvés et associés aux différents phototypes (Makova, Ramsay et al. 2001; Makova and Norton 2005). La caractérisation et le séquençage du promoteur de *MC1R* a permis d'identifier la région régulatrice minimale nécessaire à la transcription du gène (-517 à -282) et de caractériser un certain nombre de sites potentiels de liaison pour plusieurs facteurs de transcription (SP-1, CREB, MITF, USF-1) (Moro, Ideta et al. 1999).

La protéine

Le gène *MC1R* code une protéine de 317 acides aminés d'environ 37 kDa (Smith, Box et al. 2001) qui est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine G (*Figure 9*) (Mas, Gerritsen et al. 2003; Rees 2004). Il appartient à la famille des récepteurs mélanocortines qui comprend cinq membres (*MC1R*, *MC2R*, *MC3R*, *MC4R*, *MC5R*), exprimés de manière tissu spécifique selon leur fonction (*MC2R*, *MC3R* et *MC4R* sont absents des mélanocytes). Le domaine extra-cytoplasmique du récepteur va permettre la liaison aux différents ligands (α -MSH, ACTH, ASIP) pour une activation ou pour un blocage de la voie intracellulaire. Les domaines trans-membranaires permettent l'ancrage à la membrane même si le récepteur n'est pas totalement fixe et peut se déplacer le long de la membrane pour un meilleur recrutement. Enfin, les domaines intra-cellulaires interviennent, par contact avec les différentes sous-unités de la protéine G, dans la transmission du signal pour activer la voie de la protéine kinase A (PKA).

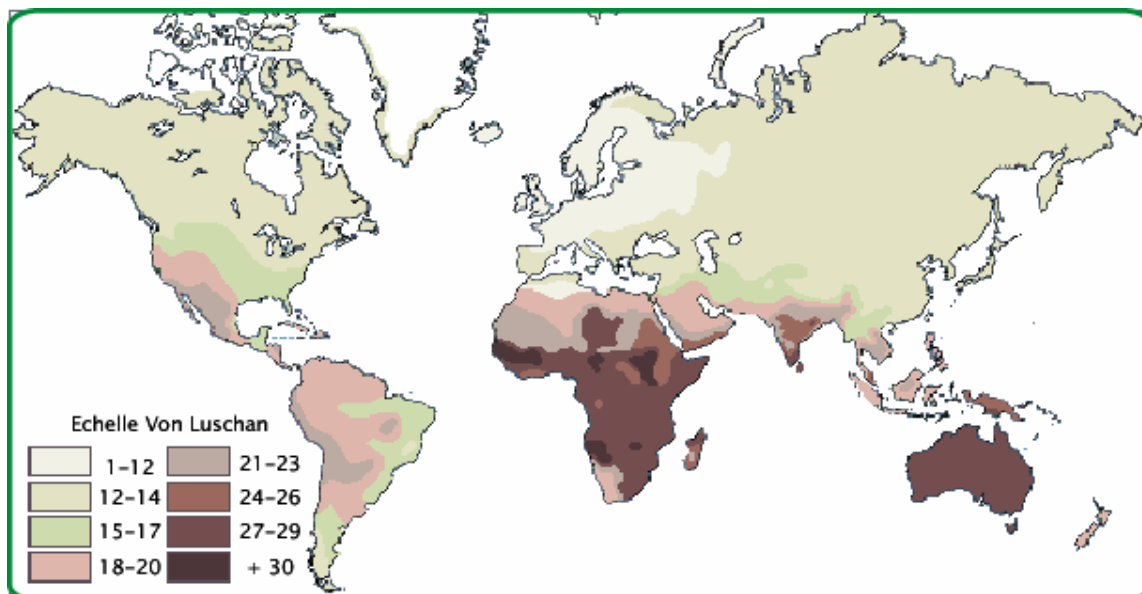


Figure 10: Pigmentation dans le monde (d'après R.Basiutti)

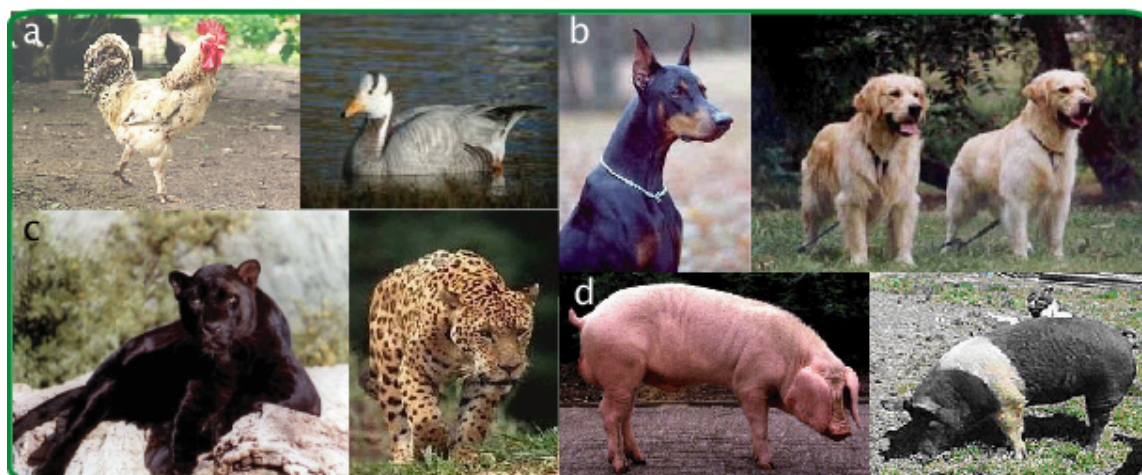


Figure 11: Association des variants de MC1R avec la couleur de la robe chez les animaux

Les différents variants de MC1R et leur association aux phototypes

Les différents variants de MC1R, principalement situés dans les régions cytoplasmiques du récepteur (*Figure 9*), n'ont pas les mêmes incidences au niveau fonctionnel ; et seuls certains d'entre eux vont avoir des conséquences au niveau de la pigmentation. Il est clairement établi que les variants du récepteur MC1R sont pour une grande part associés avec les différences de couleur de la peau et permettent de caractériser les différents phototypes, qui sont au nombre de six. La répartition géographique variable de la pigmentation (*Figure 10*) est liée au processus de sélection des variants génétiques de *MC1R* au cours de l'évolution pour une activité plus ou moins efficace du récepteur (Jablonski and Chaplin 2000). Différentes études ont ainsi associé de manière significative les variants R151C, R160W, D294H, R142H, 86insA, 537insC avec le phototype peau claire, cheveux roux de manière d'autant plus importante à l'état hétérozygote (ex : R151C et 537insC) (Flanagan, Healy et al. 2000). Ces variants sont associés à une perte d'activité fonctionnelle du récepteur qui conduit en une diminution de la synthèse de l'eumélanine (Healy, Jordan et al. 2001; Scott, Wakamatsu et al. 2002). Par contre, ces variants ne sont que très rarement retrouvés chez les individus à peau noire (Valverde, Healy et al. 1995). De la même manière, la présence de tâches de rousseur (éphélides) est multipliée par 3 en présence d'un variant à l'état homozygote et par 11 à l'état hétérozygote (Bastiaens, ter Huurne et al. 2001).

Le risque de mélanome et autres cancers

L'étude du polymorphisme de *MC1R*, ne se limite pas à de simples associations phénotypiques. Les variants de *MC1R*, qui correspondent aux phototypes peau claire et cheveux roux (V60L, R151C, R160W, D294H) sont également associés à des prédispositions variables de développer des cancers de la peau, comme les mélanomes ou les carcinomes. Des études réalisées en Australie sur les cancers de la peau du type carcinomes baso-cellulaires (BCC) ou squameux (SCC) ont montré que la présence des variants augmentait par 3,15 le risque avec une pénétrance augmentée par la présence conjointe de plusieurs variants (Bastiaens, ter Huurne et al. 2001; Box, Duffy et al. 2001; Sturm, Duffy et al. 2003). Des études comparables réalisées dans différents pays (Angleterre, Australie, France, Pays-bas) sur le mélanome, aboutissent aux mêmes conclusions. Les variants V60L, D84G, R151C, R160W, et D294H sont systématiquement associés à des risques accrus de mélanomes, pouvant être augmentés de 4 à 16 fois selon la présence d'un ou plusieurs variants (Valverde, Healy et al. 1995; Palmer, Duffy et al. 2000; Kennedy, ter Huurne et al. 2001; Matichard, Verpillat et al. 2004).

Les modèles animaux de pigmentation

Le phénotype pigmentaire, résultant de l'association des variants génétiques du récepteur MC1R, est particulièrement étudié chez l'homme. Du fait de la grande homologie de séquence de *MC1R* au cours de l'évolution, ce gène est également un très bon candidat pour expliquer la large diversité de phénotypes observables dans l'ensemble du monde animal. Ainsi, les différents variants de *MC1R* ont comme pour l'homme été associés à des différences dans la couleur de la robe ou du plumage chez de nombreuses espèces (*Figure 11*). Kerje et al. en 2003 ou Moundy et al. en 2004 ont associé respectivement chez le poulet et le cygne des variants de *MC1R* avec la couleur du plumage (*Figure 11-a*) (Kerje, Lind et al. 2003; Mundy, Badcock et al. 2004). Le chien constitue une espèce appropriée pour l'étude de la pigmentation, du fait de la grande diversité de phénotypes souvent spécifiques de races précises, et donc intéressantes du point de vue génétique (*Figure 11-b*). En 2000, la présence d'un codon stop prématuré en position R306ter du récepteur a été associée à la couleur sable du labrador et du golden retriever (Everts, Rothuizen et al. 2000; Newton, Wilkie et al. 2000). En 2003, la présence d'une perte de 5 ou 8 acides aminés dans la région extracellulaire du récepteur a été corrélée au phénomène de mélanisme chez les félins (coloration noire généralisée) (*Figure 11-c*) (Eizirik, Yuhki et al. 2003). Enfin, le variant A240T de *MC1R* correspond à la robe rose chez le cochon, alors que les variants L99P et D121N sont associés à la couleur noir (*Figure 11-d*) (Kijas, Wales et al. 1998). Ces espèces animales permettent de rendre compte de la très grande diversité de rôles et de phénotypes des variants de *MC1R*, et constituent de bons modèles d'études pour comprendre les mécanismes d'action du récepteur ainsi que l'influence des nombreux variants sur l'efficacité de synthèse de l'eumélanine.

4.1.3> Agouti

Le gène *agouti* a été largement étudié chez la souris Agouti pour sa particularité phénotypique. En effet cette souris de fond génétique C57BL6, présente une robe jaune, une surcharge pondérale, et développe un diabète de type II (insulino-résistant) (Voisey and van Daal 2002). Ce gène est très bien conservé entre les différentes espèces (90% d'homologie entre la souris et l'homme), et est localisé sur le chromosome 20 humain. Il code une protéine : "agouti-signal protein (ASIP)", synthétisée dans les cellules des papilles du derme du follicule pileux, de 131 acides aminés qui contient un peptide signal, un site de glycolysation, un domaine basique, et une partie C-terminale riche en cystéine. ASIP humain est retrouvée dans de nombreux tissus, notamment au niveau des gonades, du cœur, du tissu adipeux, dans le foie, les reins, et dans l'épiderme. La protéine ASIP a été montrée comme

étant un antagoniste des récepteurs mélanocortines (MCR), et inhiberait différentes fonctions métaboliques par blocage de la voie AMPc. La liaison de ASIP aux récepteurs MC3R et MC4R, qui sont impliqués dans la régulation pondérale, conduit au développement d'une obésité chez la souris (Voisey and van Daal 2002). De même, ASIP entre en compétition avec l' α -MSH pour MC1R et inhibe la voie de la pigmentation constitutive (*Figure 7*) (Graham, Wakamatsu et al. 1997). L'analyse par mutagenèse dirigée a permis de montrer que les acides aminés R116, F117, F118 sont essentiels pour la reconnaissance et la liaison d'ASIP aux récepteurs MCR. Ces trois résidus présentent des caractéristiques conformationnelles proches du domaine de liaison des peptides mélanotropes (His-Phe-Arg-Trp) (Voisey and van Daal 2002). La baisse de synthèse de la mélanine, en particulier de l'eumélanine, est la conséquence d'une diminution du niveau du facteur de transcription Mitf (Aberdam, Bertolotto et al. 1998) et donc de l'expression des gènes de la pigmentation (*TYR*, *TRP1*, et *DCT*) (Abdel-Malek, Scott et al. 2001). En plus de son rôle inhibiteur au niveau de la mélanogénèse, ASIP est également capable d'inhiber la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes, à l'inverse de l' α -MSH ou de la forskoline qui eux vont la favoriser (Abdel-Malek, Scott et al. 2001).

4.1.4> L'activation de la voie AMPc

L'activation de la voie AMPc après liaison de l' α -MSH à MC1R joue un rôle prépondérant dans la pigmentation constitutive (Busca and Ballotti 2000). La disponibilité en récepteurs s'avère alors essentielle. Des expériences de transfections dans des cellules ovariennes de hamster chinois, permettant de contrôler le nombre de récepteurs au niveau de la membrane, ont montré qu'il existait une corrélation entre la disponibilité de MC1R et le niveau intracellulaire en AMPc (Mas, Gerritsen et al. 2003). Pour impliquer la voie AMPc dans la pigmentation, des expériences d'inhibition de l'activité de la PKA ont été réalisées en 1998 par introduction artificielle d'un inhibiteur de la kinase. Dès lors, l'activation de la pigmentation par l' α -MSH s'est avérée inefficace avec une baisse significative de la synthèse de mélanine (Ao, Park et al. 1998). Une fois activée, la PKA est alors transférée au noyau et phosphoryle les facteurs de transcription de type b-Zip de la famille CREB (cAMP responsive element binding protein) (*Figure 7*). P-CREB active la transcription des gènes dont le promoteur possède un motif CRE (5'-TGACCTCA-3'). Ainsi, P-CREB régule l'expression du facteur de transcription spécifique des mélanocytes MITF, après liaison du promoteur (-190 à -185) (*Figure 12*) (Potterf, Furumura et al. 2000).

L'activation de la voie AMPc permet également d'induire d'autres voies de signalisation intracellulaire dans les mélanocytes, qui jouent un rôle important dans la régulation de la pigmentation. De manière intéressante, la forskoline, qui augmente le niveau en AMPc, inhibe partiellement la Phosphatidyl Inositol-3-Kinase (PI3K) et complètement la kinase RSK. Or la voie PI3K/RSK est impliquée dans l'inhibition de la mélanogénèse et dans la mise en place des dendrites. L'activation de la voie AMPc va donc favoriser la synthèse de mélanine par inhibition de la voie PI3K (Busca and Ballotti 2000). Par ailleurs, l'induction de l'AMPc permet l'activation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), ERK1, ERK2 (Extracellular signal Regulated Kinase), qui interviennent dans la régulation du facteur de transcription Mitf. L'activation de ERK par l'AMPc participe donc dans une certaine mesure à la mélanogénèse et à la régulation du développement mélanocytaire (Busca and Ballotti 2000).

4.2> Les autres voies d'activation de la pigmentation constitutive

Du fait de l'interaction étroite entre les différents types cellulaires de l'épiderme, les coopérations cellulaires entre les kératinocytes majoritaires et les mélanocytes (1 pour 40) sont importantes pour le contrôle de la mélanogénèse. Les kératinocytes sont le lieu de synthèse de plusieurs facteurs paracrines (α -MSH, FGF2, END1, SCF), dont les cibles naturelles sont situées à la membrane des mélanocytes. Ces facteurs vont intervenir dans la croissance, le maintien de la différenciation, mais surtout dans la synthèse de la mélanine. Une synthèse anormalement augmentée ou diminuée de ces différents facteurs peut être à l'origine de nombreux désordres de la pigmentation avec des hypo ou hyperpigmentations de la peau (mélanoses, taches de vieillesse, dermatite atopique, kératose séborrhéique, fibrodermatose, taches "café au lait", et vitiligo) (Imokawa 2004).

4.2.1> Stem Cell Factor/Kit

Le stem cell factor ou facteur de croissance des cellules souches, sécrété par les kératinocytes, se lie au récepteur Kit qui est un récepteur tyrosine kinase (*Figure 7*). Il est constitué de trois domaines majeurs : extracellulaire, membranaire et cytoplasmique, qui comprend les motifs de liaison à l'ATP et d'activité tyrosine kinase. Les mutations du gène codant le récepteur *KIT* sont responsables du syndrome pigmentaire : piebaldisme. Cette maladie héréditaire, transmise sous le mode autosomal dominant, est une maladie génétique du développement des mélanocytes, qui se caractérise par la présence de taches de dépigmentation au niveau de la poitrine, du front, et des cheveux liée à l'absence de

mélanocytes (*Figure 15*). Cette maladie associe un défaut de prolifération des mélanocytes et de migration de la crête neurale vers l'épiderme au cours des étapes de développement. Depuis la découverte de la première mutation du gène *KIT* en 1994 (Spritz 1994), de nouvelles mutations (Q337X, C788R, W835R, P869S, et deux substitutions de sites d'épissage) ont été associées au piebaldisme (Syrris, Heathcote et al. 2002). Le SCF en se fixant à son récepteur va permettre l'activation de la voie des MAPK intervenant dans la pigmentation constitutive par l'activation du facteur de transcription Mitf (*Figure 7*). Le couple SCF/Kit intervient de plus dans la réponse pigmentaire photo-induite. En effet, l'expression du gène *KIT* est augmentée de manière significative après stimulation par les UVB, selon un mécanisme encore inconnu. Cette induction va permettre une stimulation d'autant plus importante de la mélanogénèse (Hachiya, Kobayashi et al. 2001). Le couple est aussi impliqué dans la prolifération cellulaire. Seul ou en coopération avec les autres facteurs paracrines, le SCF et KIT vont stimuler la prolifération des mélanocytes en activant de manière plus ou moins grande la voie des MAPK (Swope, Medrano et al. 1995; Imokawa, Kobayashi et al. 2000).

4.2.2> Endothéline 1

L'endothéline 1, synthétisé par les kératinocytes et sécrété dans le milieu extracellulaire, intervient dans la prolifération mélanocytaire et la pigmentation (Yohn, Morelli et al. 1993). Les mélanocytes, n'exprimant que très peu l'endothéline, vont par contre synthétiser à leur membrane le récepteur spécifique du ligand : EDNRB qui est un récepteur lié à la protéine G, capable d'activer les différentes voies intracellulaires conduisant à la pigmentation. La liaison de l'endothéline au récepteur stimule l'activation de la tyrosinase par phosphorylation par la PKC, mais surtout active de manière importante la voie de l'AMPC conduisant à une augmentation de l'expression des gènes *TYR*, *TRP1* et *DCT* (*Figure 7*) (Imokawa, Kobayashi et al. 1997). L'endothéline 1 permettrait également pour des concentrations faibles d'induire l'expression de *POMC* et donc la synthèse de l' α -MSH. Le facteur paracrine intervient également dans la réponse photo-induite avec une expression augmentée après stimulation par les UVB (Imokawa, Kobayashi et al. 1997), permettant aux mélanocytes d'échapper à l'arrêt du cycle engendré par les UV (Tada, Suzuki et al. 1998).

4.2.3> FGF2

Le facteur de croissance fibroblastique basique (FGF2 ou bFGF) est synthétisé et sécrété de manière physiologique par les kératinocytes, et active la voie des MAPK après

fixation à son récepteur (*Figure 7*). Aucune expression n'est observée au niveau des mélanocytes à l'inverse des mélanomes (Halaban, Kwon et al. 1988). Le contrôle de la prolifération des mélanocytes nécessite un apport exogène de FGF2, alors qu'il n'est pas nécessaire pour les mélanomes, qui présentent une prolifération indépendante du milieu extracellulaire (Nesbit, Nesbit et al. 1999). Différentes expériences réalisées chez la souris, avec des greffes de peaux reconstituées, ont permis d'impliquer le FGF2 dans la mélanogénèse mais également dans la transformation en mélanome. Après stimulation par les UV au niveau des zones greffées, le FGF2 va conduire à l'apparition de cellules prolifératives de phénotype oncogénique en combinaison avec une hypopigmentation (Berking, Takemoto et al. 2001). Le FGF2, dont l'expression est induite après stimulation par les UV selon un mécanisme encore inconnu, induit l'expression du gène *MC1R* dans les lignées de mélanocytes humains normaux NHMb (Scott, Suzuki et al. 2002).

L'addition simultanée des différents facteurs paracrines sécrétés par les kératinocytes (α -MSH, FGF2, EDN1) va avoir des effets synergiques sur la mélanogénèse et la prolifération des mélanocytes. En effet, la présence simultanée de FGF2 et d' α -MSH favorise l'activité tyrosinase et la prolifération. Par contre, la présence de l'EDN1 et de FGF2 diminue l'activité tyrosinase. Enfin, la présence des trois facteurs stimule fortement la prolifération des mélanocytes (Swope, Medrano et al. 1995). Le contrôle de la balance des différents facteurs est donc essentiel pour le contrôle de la pigmentation et de la prolifération.

4.4> Le rôle du facteur de transcription Mitf

4.4.1> Le gène

Le gène *MITF* a été impliqué et identifié chez la souris du fait de l'association de la perte de ce gène avec les phénotypes engendrés. Les souris KO pour le gène *MITF*, présentent une perte de la lignée mélanocytaire et manifestent divers troubles au niveau des yeux avec une taille réduite (d'où le nom de Microphthalmia), de l'oreille interne, et des anomalies de la pigmentation de la peau. Depuis la découverte du gène, de nombreuses souris, possédant des formes mutées de *MITF* ont été établies pour étudier les désordres de la pigmentation de la peau et des yeux, ainsi que les troubles sensoriels (Steingrimsson, Arnheiter et al. 2003; Hansdottir, Palsdottir et al. 2004). L'homologue humain du gène *MITF* murin, est situé dans la région 3p12 - p14.1 du chromosome 6 (Tachibana, Perez-Jurado et al. 1994; Tassabehji, Newton et al. 1994). Cette région préalablement associée au syndrome de Waardenburg (WS) de type 2, a permis de proposer le gène *MITF* humain comme candidat potentiel de cette maladie. Le syndrome de Waardenburg est un syndrome héréditaire associé avec une perte de

la capacité auditive, et des troubles de la pigmentation de la peau des cheveux et des yeux (Tassabehji, Newton et al. 1994). Sa fréquence est de 1/40000. Il existe quatre types différents de syndromes de Waardenburg en fonction des signes cliniques associés : WS1 (déformement facial), WS2 (pas de symptôme supplémentaire), WS3 (anormalités des membres) WS4 ou syndrome de Hirschsprung (dystrophie du colon). Ces désordres sont la conséquence d'un trouble de la migration des mélanocytes au niveau de la peau, du follicule pileux, des yeux et au niveau de l'oreille interne. Le gène *MITF* humain se constitue de 10 exons, répartis sur environ 29 kb, qui code au moins quatre isoformes différentes de la protéine Mitf avec des domaines N terminaux distincts, consécutifs à un épissage alternatif du premier exon (Mitf-A, -C, -H, et -M) (Yasumoto, Amae et al. 1998; Fuse, Yasumoto et al. 1999). La forme Mitf-M est spécifique de la lignée mélanocytaire.

4.4.2> La protéine

La protéine Mitf, de 422 acides aminés et d'environ 48 kDa, appartient à la famille des facteurs de transcription de type : basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper (bHLH-LZ) et présente de grandes homologies des domaines de liaison à l'ADN (b) et de dimérisation (HLH-LZ) avec les facteurs de transcription de la même famille tels que TFEB, TFEC, TFE3, Myc, Max, ou USF. *In vivo*, Mitf se lie à l'ADN sous forme d'homodimère, cependant *in vitro*, une hétérodimérisation avec les facteurs TFE a été observée (Hemesath, Steingrimsson et al. 1994; Goding 2000).

Le facteur Mitf active la transcription de certains gènes, après interaction spécifique aux motifs consensus (tCATGTGa) appelés boîtes M des promoteurs. Du fait de la grande représentation de ces motifs sur l'ensemble du génome, le facteur Mitf doit être capable de sélectionner de manière précise les gènes dont l'expression doit être régulée. Des expériences ont permis de montrer *in vivo* et *in vitro* que la présence des résidus T en 5' et A en 3' du motif consensus est essentielle à la liaison de Mitf au promoteur des gènes pour induire leur transcription. De cette manière, Mitf est capable de réguler très précisément l'expression spécifique de ces différents gènes (Aksan and Goding 1998).

4.4.3> L'activation de la transcription

L'utilisation des modèles de souris pour le syndrome de Waardenburg (WS) a permis l'identification et la caractérisation des gènes impliqués dans la pathologie, ainsi que leurs différentes interactions (Tachibana, Kobayashi et al. 2003). Le facteur de transcription Pax 3 (paired box domain) est associé avec le WS de type 1 et 3.

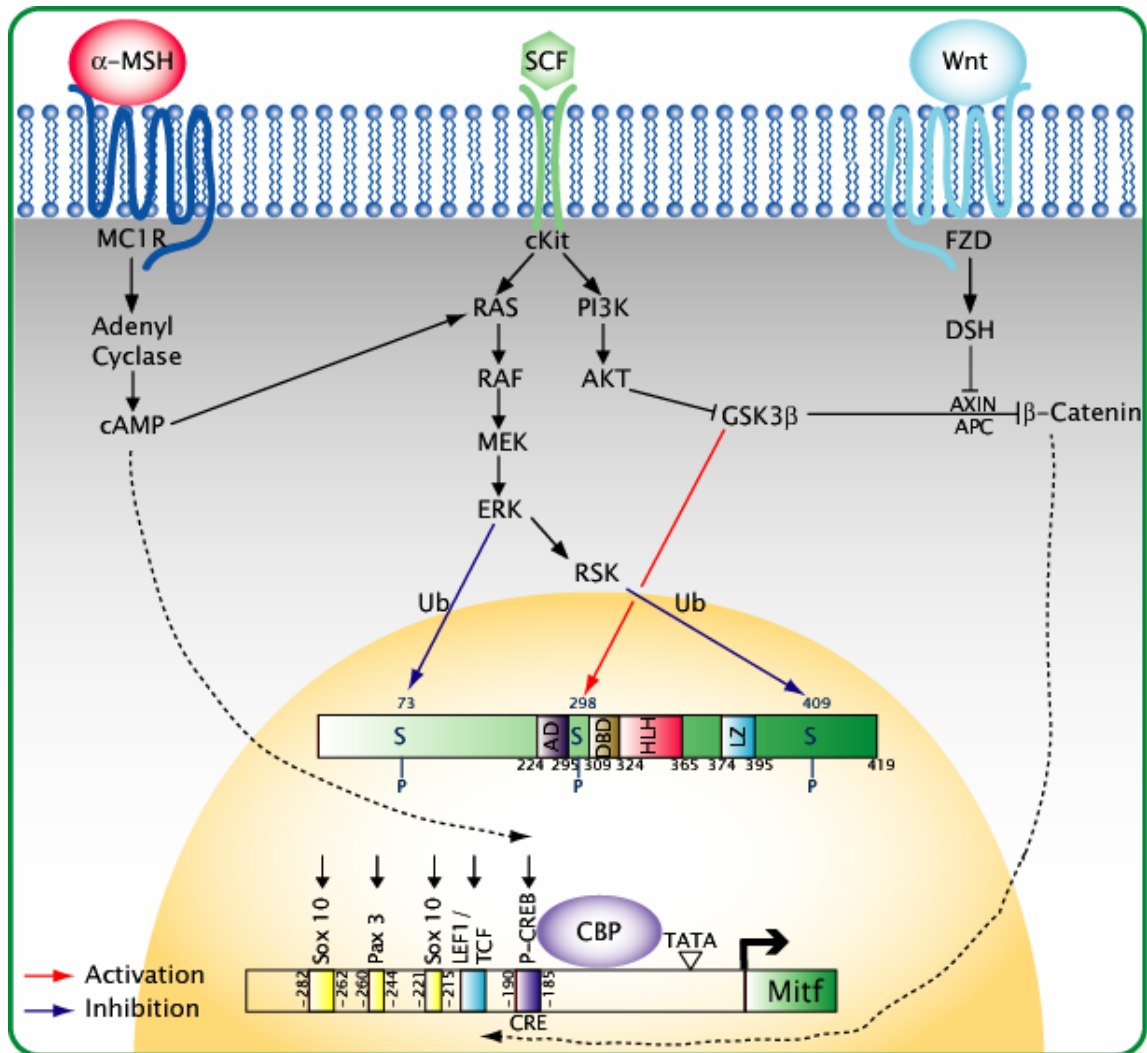


Figure 12: Voies d'activation du facteur de transcription Mitf (d'après Goding, 2000)

Mitf et la protéine Slug sont associés au WS de type 2. Le facteur de transcription Sox 10 ((Sex determining region Y)-box 10) et le couple ligand-récepteur endothelin 3 (EDN3)-EDNRB sont associés au WS de type 4. Il existe des régulations croisées entre ces différents facteurs de transcription, qui interviennent dans le développement des mélanocytes au niveau de la crête neurale et au niveau de la peau. Différentes études ont tout d'abord montré que le facteur Pax 3 induit la transcription de *Mitf* de manière significative (x10), après fixation du promoteur (-260 à -244) (*Figure 12*) (Potterf, Furumura et al. 2000). Dès lors que *PAX 3* est muté, il n'est plus capable de cette transactivation (Watanabe, Takeda et al. 1998). Le facteur de transcription Sox 10 a également été impliqué dans la régulation de la transcription de *MITF* par des expériences de transfections ou par l'utilisation de souris KO pour le gène *SOX10* (Potterf, Furumura et al. 2000). Sox 10 permet, après liaison du promoteur de *MITF* (-282 à -262), d'augmenter d'un facteur 500 la transcription du gène (*Figure 12*). Les facteurs de transcription Pax 3 et Sox 10 interviennent très précocement au moment du développement mélanocytaire et de manière synergique (x1500) dans l'activation de l'expression du gène *MITF* (Bondurand, Pingault et al. 2000; Widlund and Fisher 2003). L'activation de Mitf par la voie AMPc semble aussi être dépendante de la présence simultanée des facteurs CREB et Sox 10, l'absence de Sox 10 empêchant la stimulation par la voie AMPc (Huber, Price et al. 2003). Enfin, la voie de signalisation Wnt, impliquée dans la transformation et la migration des mélanoblastes et des mélanocytes, dans l'adhésion cellulaire et dans la transcription des gènes impliqués dans le développement mélanocytaire, intervient dans la régulation de l'expression de *MITF* (Dorsky, Raible et al. 2000; Larue, Kumasaka et al. 2003). L'activation de la voie Wnt va conduire à la translocation dans le noyau de la β -caténine, interagissant avec le facteur de transcription LEF/TCF (lymphoid enhancing factor-1/transcription factor). Ainsi, la liaison du couple au promoteur du gène *MITF* et le recrutement de la CBP300 participe à l'expression du gène (*Figure 12*) (Goding 2000; Saito, Yasumoto et al. 2003).

4.4.4> L'activation post-traductionnelle

Le facteur Mitf est activé ou inhibé par modifications post-traductionnelles, impliquant différents mécanismes de phosphorylation, d'ubiquitination, de sumoylation (Miller, Levy et al. 2005), ainsi que le recrutement de cofacteurs de transcription (Vance and Goding 2004). La protéine Mitf est régulée par la voie des MAPK, stimulée par le stem cell factor se liant au récepteur c-Kit, qui va permettre la phosphorylation par les kinases ERK1 et -2 de la sérine 73. Cette phosphorylation va dans un premier temps permettre l'activation de Mitf en favorisant la liaison avec le cofacteur transcriptionnel CPB300 (Busca and Ballotti 2000) ;

puis dans un second temps va inhiber l'action de Mitf en permettant l'ubiquitination de la protéine et donc sa dégradation par le système du protéasome (*Figure 12*) (Xu, Gong et al. 2000). Cette dégradation est également induite par la phosphorylation de la Ser409 par la kinase RSK. L'activation de la voie AMPc peut conduire à l'inhibition de la PI3K, or une des cibles préférentielles de la PI3K est la sérine-thréonine kinase AKT (Alpha RAC serine/threonine-protein kinase). Une fois phosphorylée, la kinase AKT ne joue plus son rôle inhibiteur de la protéine membranaire GSK3 β (Glycogen Synthase kinase 3 β), qui dès lors est capable d'induire la phosphorylation de la sérine 298 de Mitf, qui est indispensable à la liaison de l'ADN et l'activité transcriptionnelle (*Figure 12*). L'expression du gène *TYR* est augmentée en présence de la forme phosphorylée de Mitf (Ser 298) (Takeda, Takemoto et al. 2000). La voie AKT/GSK3 β intervient donc dans la régulation de la mélanogénèse et dans la différenciation mélanocytaire en activant par phosphorylation le facteur de transcription Mitf (Khaled, Larriere et al. 2002). Il existe également une relation entre la voie de la GSK3 β et la voie Wnt/ β -caténine. La GSK3 β inhibe la synthèse de la β -caténine qui joue un rôle important dans la différenciation mélanocytaire et dans la mélanogénèse (Larue, Kumasaka et al. 2003). La GSK3 β a donc un rôle paradoxal d'activation de la protéine Mitf par phosphorylation et d'inhibition de sa transcription. Enfin, sous l'action de la kinase de réponse au stress p38, Mitf est phosphorylé au niveau de la Ser307 qui permet d'augmenter sa capacité d'activation de la transcription (Widlund and Fisher 2003; Vance and Goding 2004).

4.4.5> La régulation de l'expression des différents gènes

Les souris KO pour le gène *MITF* sont dépourvues de lignées mélanocytaires, suggérant un rôle essentiel du gène *MITF*. De plus, les motifs consensus (CATGTG) sont fréquemment retrouvés sur l'ensemble des promoteurs du génome. Les cibles du facteur de transcription Mitf sont donc potentiellement nombreuses. Parmi celles-ci, Mitf est capable de réguler de manière spécifique l'expression de nombreux gènes intervenant dans la pigmentation, la différenciation ou le développement, après fixation des boîtes M (*Figure 13*).

Les gènes de la pigmentation

Les premiers gènes qui ont été décrits comme étant régulés par Mitf sont les gènes qui codent pour les enzymes intervenant dans la synthèse de la phéo et de l'eumélanine (cf. § La mélanogénèse, page 39) (*Figure 13*). Mitf est capable de se lier au niveau des promoteurs pour activer la transcription des gènes *TYR*, *TRP1*, *DCT*. Ainsi, Mitf active après fixation de

la boîte M (tCATGTG_a) en position -109 du promoteur minimal, l'expression du gène *TYR* pour induire de manière significative sa transcription (Yasumoto, Yokoyama et al. 1994). De la même manière, l'analyse du promoteur du gène *TRP1* met en évidence la présence de boîtes M pouvant lier Mitf (Yasumoto, Yokoyama et al. 1997) pour une augmentation de son expression (Fang and Setaluri 1999). L'induction de l'expression de *TRP1* n'est pas limitée au facteur Mitf. Pax 3 est en effet capable de se lier au niveau de deux motifs supplémentaires appelés MSE_u et MSE_i contenant la séquence GTGTGAN₆ATTA, participant à l'activation de la transcription du gène *TRP1* (Galibert, Yavuzer et al. 1999). Cette coopération entre les facteurs Mitf et Pax 3 permet d'accroître la synthèse de Trp-1 et donc son activité.

La cinétique d'expression du gène *DCT* suit la cinétique d'expression de *MITF* mais pas celle des gènes *TYR*, et *TRP1*. Le promoteur de ce gène possède une boîte M en position -135 (tCATGTG_g), associé avec un site de fixation ERE pour le récepteur nucléaire à l'oestradiol ER α , ainsi qu'un site AP1. Le facteur de transcription Mitf en combinaison avec ER α et la protéine CBP300 est capable d'activer de manière synergique la transcription du gène *DCT* (Schwahn, Timchenko et al. 2005). De la même manière que pour la régulation du gène *TRP1* avec les facteurs Mitf et Pax 3 ; il existe une coopération entre les facteurs Mitf et Sox 10, pour permettre l'induction du gène *DCT*. La région comprise entre -459 et -431 du promoteur est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de Sox 10, qui est augmentée de manière synergique importante en présence du facteur Mitf, 300 pb en aval (Jiao, Mollaaghababa et al. 2004; Ludwig, Rehberg et al. 2004).

Le facteur de transcription Mitf intervient également dans la régulation de l'expression des gènes de la pigmentation situés plus en amont dans le but d'amplifier la stimulation de la mélanogénèse. En effet, la protéine Mitf est capable de se lier au promoteur du gène *MC1R* au niveau de la boîte M (CATGTG) en amont du site d'initiation en position -461, et d'induire l'expression du gène *MC1R* d'environ 5 fois (Aoki and Moro 2002). Le facteur Mitf intervient également en activant l'expression du gène *KIT*, activateur de la voie des MAPK, après fixation du motif (CACCTG) en position -356 du promoteur (Tsujimura, Morii et al. 1996).

A l'origine identifié comme un antigène spécifique du mélanome humain (AIM1 : Associated In Melanoma), la protéine MATP de 530 acides aminés est exprimée dans différentes lignées de mélanocytes et mélanomes.

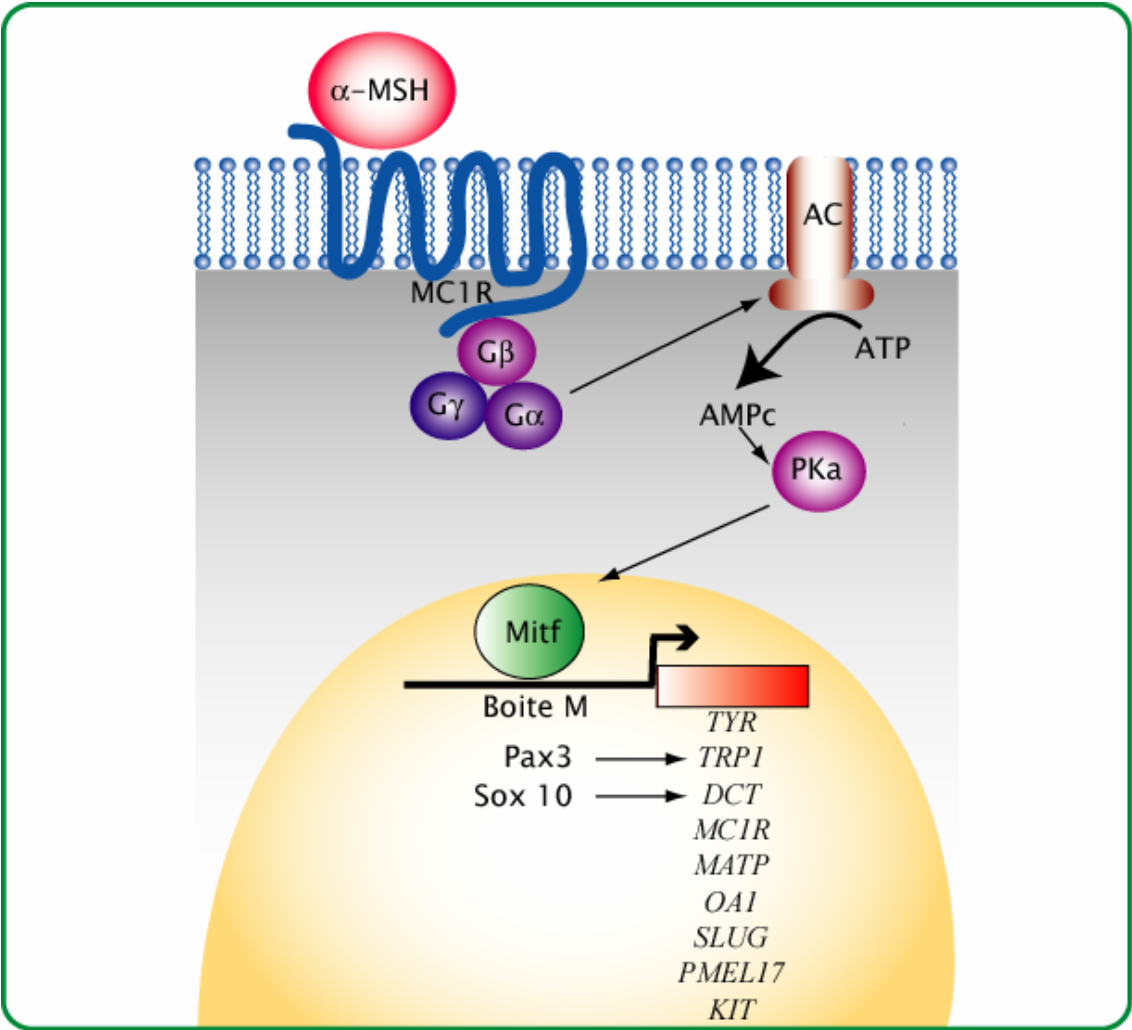


Figure 13: Mitf: régulateur de l'expression des gènes de la pigmentation

Le gène *MATP* humain, localisé sur le chromosome 5p comprend 5 exons répartis sur 40 kb, et code une protéine à 12 domaines transmembranaires, qui possède vraisemblablement un rôle de transporteur. Le gène *MATP* a été impliqué dans la pigmentation du fait de l'association de plusieurs mutations de ce gène avec un nouveau type d'albinisme oculaire cutané (OCA4) (Graf, Hodgson et al. 2005). Des expériences de transfection ont montré que Mitf était capable d'induire l'expression du gène *MATP* de manière significative. Cependant, malgré la présence de boîtes M au niveau du promoteur de *MATP*, l'analyse par immunoprécipitation de chromatine (CHIP) n'a pas permis d'établir une liaison directe du facteur de transcription avec le promoteur. Le mécanisme de régulation est vraisemblablement dépendant d'intermédiaires de régulation, ou de la stabilité de l'ARN, mais celui-ci est encore inconnu à ce jour (Du and Fisher 2002).

L'albinisme oculaire de type 1 (OA1) est lié à un défaut de la synthèse des mélanosomes, lieu de synthèse de la mélanine. Dans la peau des patients atteints de OA1, la mélanine s'accumule dans des vésicules plus larges que la normale, appelés macromélanosomes. Le gène associé à la maladie est le gène *OAI* (Xp22.3) codant une protéine membranaire des mélanosomes qui semble être associée aux protéines G mais dont la fonction claire n'est pas encore définie. L'analyse histologique des mélanosomes des patients atteints permet de suggérer que la protéine OA1 doit intervenir dans la formation des organelles (Schiaffino and Tacchetti 2005). Le promoteur du gène *OAI* contient plusieurs boîtes M, dont une en position -28 (CACATGa) conservée entre la souris et l'homme qui semble être un site de liaison préférentiel du facteur Mitf, avec une spécificité accrue en présence du résidu A en 3' du motif consensus. Le facteur de transfection a été montré comme capable d'induire l'expression *in vivo* et *in vitro* de *OAI* chez la souris, après liaison à ce motif. Cette induction est conservée chez l'homme (Vetrini, Auricchio et al. 2004).

Le gène *PMEL17* (ou *SILV*) est l'homologue humain du gène murin *silver*, locus qui est associé chez la souris à un désordre de pigmentation conduisant à un phénotype argenté. La fonction précise de la protéine Pmel17 n'est que partiellement définie, mais Pmel17 localisée dans les mélanosomes précoces, doit jouer un rôle dans la structure des organelles, mais aussi dans la synthèse de l'intermédiaire de l'eumélanine : DHICA en permettant sa polymérisation. Pmel 17 constitue également un antigène spécifique des mélanocytes et mélanomes. Du et al. ont montré par CHIP et par expériences de gel retard que Mitf est capable de se lier à la boîte M (tCATGTG) positionnée dans le premier intron du gène *PMEL17* (+479). Le facteur de

transcription induit alors l'expression de *PMEL17* en corrélation avec son propre niveau d'expression (Du, Miller et al. 2003).

Les gènes du développement mélanocytaire

La protéine Slug (Slugh chez la souris), est un facteur de transcription exprimé dans les cellules migratoires de la crête neurale. Son rôle dans la différenciation des mélanocytes a été établi, après invalidation du gène *Slug* murin, qui conduit à des désordres de la pigmentation caractéristiques d'une anomalie de développement (dépigmentation au niveau de la partie ventrale et du front) (*Figure 16-b*). De même, certains patients atteints du syndrome de Waardenburg de type 2, lié à des anomalies pigmentaires et auditives, présentent une perte du gène *SLUG*. Le facteur de transcription Mitf est capable de réguler l'expression du gène *SLUG* après fixation de la boîte M positionnée 1396 pb en amont du site initiateur de la transcription (Sanchez-Martin, Rodriguez-Garcia et al. 2002).

La voie du récepteur tyrosine kinase Kit stimulée par le facteur paracrine Stem Cell Factor (SCF) intervient à différents niveaux de la mélanogénèse en permettant l'activation et la régulation du facteur de transcription Mitf par la voie des MAPK (cf. § Le rôle du facteur de transcription Mitf, page 52) (Opdecamp, Nakayama et al. 1997). Cette voie intervient également de manière importante dans le développement et la différenciation des mélanocytes. Comme pour les facteurs précédents, les mutations du gène *KIT* sont à l'origine d'un syndrome héréditaire pigmentaire : le piebaldisme (qui se caractérise dans les cas majeurs par une dépigmentation généralisée, ou sinon par des tâches de décoloration au niveau de la poitrine et du front) (*Figure 16-b*) (Syrris, Heathcote et al. 2002). Des expériences réalisées sur des mélanoblastes issus d'embryons pour lesquels le gène *KIT* est absent, montrent l'importance de Kit dans l'activation de Mitf pour activer l'expression des gènes différenciés (*TYR*, *TRP1*...) (Hou, Panthier et al. 2000). A l'inverse, le facteur Mitf intervient également en activant l'expression du gène *KIT*, après fixation du motif (CACCTG) en position -356 du promoteur (Tsujimura, Morii et al. 1996). Les souris hétérozygotes pour *Slug* et pour *Kit* présentent des anomalies de dépigmentation cumulatives qui montrent qu'il existe *in vivo* une interaction entre ces deux gènes (Sanchez-Martin, Rodriguez-Garcia et al. 2002).

Les gènes de la prolifération cellulaire

Le facteur de transcription Mitf joue un double rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules de la lignée mélanocytaire. Il inhiberait tout d'abord l'apoptose cellulaire en induisant l'expression du gène antiapoptotique *BCL2* (B-cell lymphoma protein 2). Mitf lie *in vivo* le promoteur du gène *BCL2* au niveau d'un motif boîte M (CATGTG), participant ainsi à la régulation de son expression. Un niveau élevé de Mitf et Bcl2 semble être conservé dans les mélanomes avec un niveau d'apoptose faible et donc une survie cellulaire importante (McGill, Horstmann et al. 2002). Le contrôle de *BCL2* par Mitf dans les mélanomes, et leur rôle dans la survie cellulaire peut ainsi permettre d'expliquer la résistance importante des mélanomes aux traitements.

D'autre part, Mitf contrôle l'expression des gènes *CDKN1A* et *CDKN2A* codant respectivement les inhibiteurs de la famille des CDKI p21/Waf1 et p16/Ink4a. Ces deux CDKI sont indispensables à la survie des mélanocytes et au maintien du caractère différencié des cellules en favorisant l'arrêt du cycle en phase G1 par inhibition de la cyclin D. Mitf, en coopération avec la forme hypophosphorylée active de la protéine Rb, est capable de se lier au promoteur de *CDKN1A* sur une boîte M conservée (tCATGTGa) et d'induire son expression ; (Carreira, Goodall et al. 2005). De même, Mitf favorise la sortie du cycle en régulant l'expression de l'inhibiteur du cycle et gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* et en conduisant à l'hypophosphorylation de la protéine Rb. Mitf se lie sur la boîte M en position -1427 du promoteur humain du gène *CDKN2A* et active sa transcription (Loercher, Tank et al. 2005). L'augmentation du niveau de p21 et de p16 par Mitf, va favoriser le caractère différencié des mélanocytes. A l'inverse dans les mélanomes, l'activation de la dégradation par le protéasome de Mitf lors de mutation du gène *BRAF*, va conduire à la diminution de l'expression de *CDKN1A* et *CDKN2A* et donc du contrôle du cycle. Enfin, l'expression du gène *CDKN2A* est régulée de manière positive par les rayonnements ultraviolets, avec une augmentation de 30% après 5h (Piepkorn 2000). Cette régulation UV-dépendante est peut être associée à l'activation de la voie AMPc par l' α -MSH. En effet, l' α -MSH à la suite d'une induction par les UV est capable de stimuler l'expression de *CDKN2A*, probablement par l'intermédiaire du facteur de transcription Mitf (Pavey and Gabrielli 2002). Aux vues de nos résultats (cf. § Résultats, page 131), le facteur de transcription USF-1, activé par les UV, est susceptible également d'intervenir dans cette régulation.

facteurs influençant la pigmentation	niveau de régulation	conséquences sur la mélanogénèse
disponibilité en tyrosine diffusion membranaire activité de la PAH	perméabilité membranaire allostérique via le 6BH4	induction variable de la voie AMPc
activité tyrosinase pH intramélanosomal	pompes à protons, protéine P	variation d'activité tyrosinase transport de Tyr et Trp-1
régulation allostérique	allostérique via le 6BH4, α -MSH, H ₂ O ₂ (<10 ⁻⁴ M)	inhibition activité tyrosinase, variation expression TYR, TRP1, DCT
dommages de l'ADN dimères de pyrimidine	expression des gènes	potentialisation de l' α -MSH
oxide nitric stimulation PKG	phosphorylation de la tyrosinase	activation de la tyrosinase
voie de la PKC production de DAG, PKC β	phosphorylation de la tyrosinase	activation de la tyrosinase
facteurs paracrine FGF2	mélanogénèse, prolifération	variation expression TYR, TRP1, DCT
EDN1	mélanogénèse, prolifération	variation expression TYR, TRP1, DCT
Stem Cell Factor	mélanogénèse, prolifération	variation expression TYR, TRP1, DCT

Tableau 1: Les facteurs influençant la pigmentation constitutive

4.5> Les facteurs influençant la mélanogénèse

La synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine est régulée par un grand nombre de voies intracellulaires et mécanismes sous l'influence d'un grand nombre de facteurs, dont les principaux seront abordés successivement (*Tableau 1*).

4.5.1> La biodisponibilité en tyrosine

La L-Tyrosine constitue le précurseur de la synthèse des deux types de mélanine. Sa biodisponibilité dans le mélanocyte est donc essentielle pour la mélanogénèse. La L-tyrosine peut diffuser de manière facilitée à travers la membrane ou être synthétisée dans le cytosol des mélanocytes humains à partir de la L-phénylalanine, en présence de PAH (Phénylalanine Hydroxylase) activée (Schallreuter, Wood et al. 1994). Le cofacteur 6BH₄ (6R 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine) contrôle l'activité enzymatique de la PAH en formant des tétramères inactifs de PAH/6BH₄. La production de tyrosine à partir de la phénylalanine est régulée par l' α -MSH. En effet, l' α -MSH en se liant au 6BH₄, libère la PAH des tétramères inactifs qui catalyse la formation de la tyrosine et régule ainsi l'approvisionnement en Tyrosine (Schallreuter, Moore et al. 1999). Un niveau faible en tyrosine, favorise la prolifération des mélanocytes, alors qu'un niveau élevé favorise la mélanogénèse en jouant notamment sur l'efficacité d'induction de l'expression des gènes de la pigmentation par Mitf. Le transport des substrats de la mélanogénèse (tyrosine et cystéine) à l'intérieur des mélanosomes est également essentiel pour une pigmentation efficace.

4.5.2> L'influence de la régulation allostérique et de l'H₂O₂

L'activité de la tyrosinase et de la PAH peut être directement régulée par un mécanisme allostérique dépendant du cofacteur 6BH₄. En effet, le 6BH₄ joue le rôle d'inhibiteur allostérique en se fixant à la tyrosinase (Wood, Chavan et al. 2004) ou à la PAH sous forme de tétramères qui sont dès lors inactives (Schallreuter, Wazir et al. 2004). La L-tyrosine n'est alors pas disponible et ne peut pas être transformée en DOPAquinone. L' α -MSH est capable de fixer le 6BH₄, libérant ainsi les deux enzymes qui sont alors actives. Ceci suggère une autre voie de régulation de la mélanogénèse par l' α -MSH. En présence de 6BH₄ et de tyrosinase, il y a formation de H₂O₂. Or, le peroxyde d'hydrogène, pour de faibles concentrations ($<3.10^{-4}$ M), est capable d'induire l'activité tyrosinase et donc de stimuler la pigmentation (Wood, Chavan et al. 2004). Par contre si la concentration en H₂O₂ est supérieure, l'activité des enzymes tyrosinase, Trp-1 et Dct est largement diminuée. Le niveau d'expression des différents gènes de la pigmentation (*TYR*, *TRP1*, *DCT*) va également être

réduit, du fait d'une diminution de l'expression du gène *MITF* (Jimenez-Cervantes, Martinez-Esparza et al. 2001). La régulation de l'activité tyrosinase par un mécanisme allostérique ou par un mécanisme oxydatif est importante pour le contrôle de la mélanogénèse.

4.5.3> L'activité tyrosinase et son association avec le type de peau

Les variations de couleurs de la peau entre les ethnies ne semblent pas être liées à une variation dans le nombre de mélanocytes au niveau de la peau (Alaluf, Barrett et al. 2003), mais au contrôle de la quantité et du type de mélanine synthétisée. Les variations de la synthèse de mélanine peuvent être liées à des activations plus ou moins efficaces de la voie AMPc, associées à différents variants du récepteur MC1R (cf. § MC1R, page 43) (Scott, Wakamatsu et al. 2002). Mais, elles peuvent aussi être associées à des différences d'activité de l'enzyme tyrosinase. Celle-ci est 10 fois supérieure dans les mélanocytes des populations négroïdes que dans les populations caucasiennes (Abdel-Malek, Swope et al. 1993). Cette différence d'activité n'est cependant pas associée à des variations du niveau d'expression des gènes *TYR*, *TRP1*, *POMC* et *EDNI* (Alaluf, Barrett et al. 2003).

4.5.4> Le pH intramélanosomal

Les mesures d'activité tyrosinase en fonction du pH intramélanosomal ont montré que celles-ci étaient maximales pour un pH neutre (6,8), alors qu'elles chutaient assez rapidement quand le pH diminuait. A partir d'un pH de 5,5, l'activité tyrosinase est inhibée et la synthèse de mélanine diminuée. En neutralisant de manière artificielle le pH intramélanosomal, le rapport eumélanine/phéomélanine augmente de manière significative (Ancans, Tobin et al. 2001). Le pH varie en fonctions des ethnies, les peaux claires ont un pH faible associé avec une activité tyrosinase réduite alors que le pH pour les peaux noires est supérieur et donc lié à une activité tyrosinase élevée. Le pH influence également le transport des enzymes tyrosinase, et Trp-1 du réticulum endoplasmique vers la membrane des mélanosomes, par une ségrégation dans l'appareil de Golgi (Watabe, Valencia et al. 2004). Il intervient enfin dans la maturation des mélanosomes. Dans la cellule, les variations du pH sont obtenues à l'aide de pompes à protons qui diminuent le pH intramélanosomal, ou de la protéine P qui l'augmente. La protéine P est un canal de type Na⁺/H⁺, dont la mutation du gène P est associée à l'albinisme oculaire cutanée de type 2 (OCA2) (Brilliant and Gardner 2001). Ainsi, la régulation du pH intramélanosomal est un facteur clé dans le contrôle du rapport eumélanine/phéomélanine ainsi que dans la maturation des mélanosomes.

4.5.5> La régulation par NO

L'oxide nitrique (NO) module vraisemblablement la mélanogénèse. En effet, les mélanocytes humains en culture, en réponse à une irradiation par les UVB, synthétisent du NO (Romero-Graillet, Aberdam et al. 1996). Or, le traitement de cellules avec du NO a pour conséquences d'activer la mélanogénèse par induction de l'expression du gène *TYR*, et par activation de la tyrosinase après phosphorylation par la PKG (Ser 505 et 509). Après irradiation par les UVB, la stimulation d'une NO synthase constitutive conduit à la production de NO à partir de L-arginine, puis à la production de GMPc par activation de la guanylate cyclase cytoplasmique, et enfin à l'activation de la PKG (Romero-Graillet, Aberdam et al. 1996; Sasaki, Horikoshi et al. 2000). Le NO joue un rôle d'activateur de la mélanogénèse, identique à l' α -MSH, en participant à l'augmentation du rapport eumélanine/phéomélanine (Lassalle, Igarashi et al. 2003). Par ailleurs, l' α -MSH augmente la production de NO dans les mélanocytes humains en réponse aux UV ou aux lipopolysaccharides en modulant la nitrique oxyde synthase (Tsatmali, Graham et al. 2000). En réponse aux UVB, les mélanocytes et les kératinocytes synthétisent du NO qui joue le rôle d'activateur intra ou intercellulaire de la mélanogénèse.

4.5.6> La voie PKC

Les phospholipases C et D sont responsables de la production de diacylglycérol (DAG) dans la cellule. Or, l'adjonction de DAG dans le milieu de culture des mélanocytes stimule la mélanogénèse (Gilchrest, Park et al. 1996). Le DAG, est un second messenger qui est connu pour son rôle activateur de la PKC, qui est essentielle à différentes fonctions cellulaires. L'isoforme β de la PKC a été impliquée dans la mélanogénèse en permettant l'activation de la tyrosinase par phosphorylation des résidus sérine 505 et 509 dans le domaine cytoplasmique de la protéine associée à la membrane des mélanosomes (Park, Perez et al. 1999). La voie de la PKC est clairement impliquée dans la pigmentation constitutive, dans la mesure où l'induction de la mélanogénèse par l' α -MSH, nécessite la présence de la voie PKC fonctionnelle (Park, Russakovsky et al. 1996) La voie intervient aussi dans la réponse pigmentaire dépendante des UV (Carsberg, Warenius et al. 1994). La coopération entre les voies PKA et PKC est essentielle à la pigmentation constitutive.

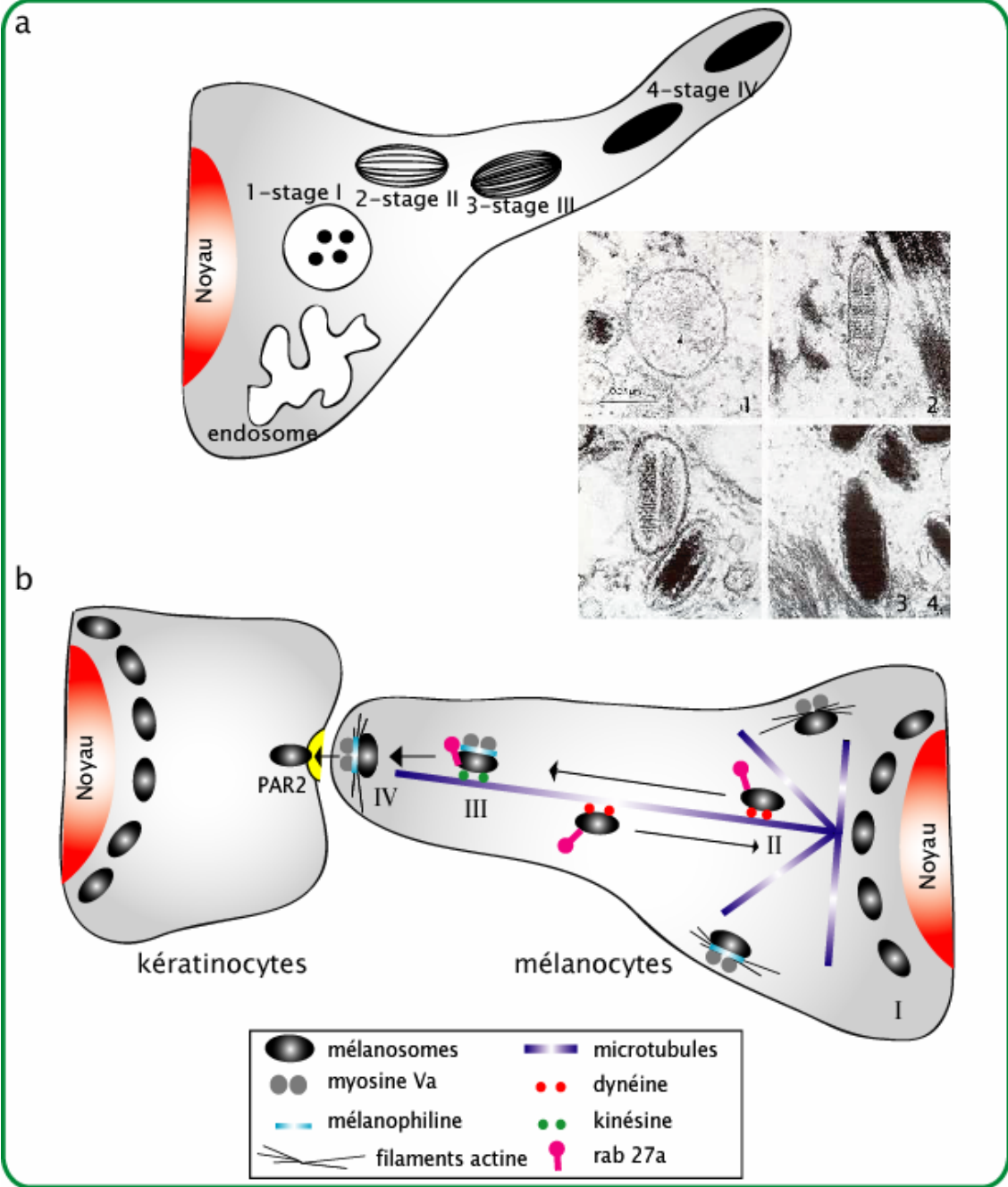


Figure 14: Migration et transfert des mélanosomes

4.6> Le transfert de la mélanine

La mélanine est le pigment produit par les mélanocytes au niveau d'organites ovoïdes cytoplasmiques : les mélanosomes. Ils résultent de la fusion entre des vésicules, contenant de la tyrosinase, de la dopachrome tautomérase (Dct) et de la DHICA oxydase (Trp-1), dérivées de l'appareil de Golgi et des vésicules contenant les composants structurels des mélanosomes produites par le réticulum endoplasmique granulaire. On peut distinguer deux types de mélanosomes selon le type de mélanine produite : les eumélanosomes, de grande taille (0,3 à 0,9 μm) et ellipsoïdaux ; des phéomélanosomes plus petits (0,7 μm) et sphériques (Jimbow, Hua et al. 2000). Ces organites contiennent un matériel fibrillaire ou lamellaire présentant une périodicité caractéristique.

4.6.1> La biogénèse des mélanosomes

Quatre stades de différenciation sont classiquement décrits pour les mélanosomes (*Figure 14-a*) (Jimbow, Hua et al. 2000) :

Les mélanosomes de stade I sont communs à la phéo et à l'eumélanogénèse et proviennent du réticulum endoplasmique lisse (REL). Parfois appelés prémélanosomes, ils comportent des vésicules internes (proches de celles observées dans les endosomes tardifs) avec des structures en fibres irrégulières.

Les mélanosomes de stade II sont formés par la fusion des mélanosomes de stade I avec des vésicules bourgeonnant de l'appareil de Golgi, et se remplissent d'une structure interne filamenteuse. Dans le cas des eumélanosomes, l'ensemble des enzymes mélanogènes (tyrosinase, Trp-1 et Dct ainsi que Pmel17 et la protéine P) est présent au niveau de la membrane. Dans les phéomélanosomes, seule la tyrosinase est présente, les autres enzymes échappant au processus de transport.

Les mélanosomes de stade III synthétisent de la mélanine qui est déposée régulièrement sous forme de stries dans l'eumélanosome ou qui se trouve au sein de granules dans le phéomélanosome.

Les mélanosomes de stade IV accumulent une quantité importante de mélanine et sont transportés à la périphérie du mélanocyte.

Les phéomélanosomes, ne contiennent que des granules (produits de dégradation lysosomale) et quelque soit le stade, ils ne possèdent pas de structure organisée. Ils ont les caractéristiques morphologiques et biochimiques des lysosomes, si ce n'est la présence de tyrosinase et de la phéomélanine.

La taille des organelles est importante pour la détermination de la pigmentation. En effet, les mélanosomes des individus négroïdes sont plus gros que ceux des individus à peau claire, ils sont empaquetés et non groupés. La dégradation des eumélanosomes dans le kératinocyte est aussi ralentie ce qui contribue à une meilleure pigmentation.

4.6.2> Le transport des mélanosomes

Au cours de leur maturation, les mélanosomes sont transportés dans les mélanocytes du centre de la cellule vers les extrémités des dendrites. Ce transport fait appel à différents moteurs permettant le déplacement des mélanosomes le long des filaments de microtubules (*Figure 14-b*). Par l'intermédiaire de la dynéine, les mélanosomes migrent le long des dimères de microtubules d' α et de β -tubuline vers les dendrites. La dynéine est en effet une des protéines motrices ATPase dépendante, indispensable au transport des mélanosomes, après formation d'un complexe intermédiaire dynactine, qui permet la liaison aux microtubules (Byers, Yaar et al. 2000). En progressant vers les dendrites, les organelles interagissent avec des protéines de la famille des Rab GTPases (Rab 27a, Myosine Va...). Ces protéines sont des GTPases monomériques de la super famille Ras, qui interviennent dans le transfert cellulaire des vésicules, et dont les dysfonctionnements sont associés à plusieurs syndromes (Griscelli, Hermansky-Puldak) (Seabra, Mules et al. 2002). La protéine Rab 27a intervient spécifiquement dans le transfert des mélanosomes en se fixant à la membrane des mélanosomes (Hume, Collinson et al. 2001). Dès lors, elle permet la fixation de la myosine Va et de la mélanophiline. Plusieurs mutations du gène RAB27A (W73G, L130P, A152P) sont responsables du syndrome de Griscelli de type 2 (GS2). Ce syndrome génétique se caractérise par une dilution de la pigmentation de la peau et des cheveux et à une accumulation des mélanosomes dans les mélanocytes, il est également associé à des troubles neuronaux (GS1) ou de troubles immunologiques (GS2) (Bahadoran, Busca et al. 2003). L'action de la Rab 27a se déroule au niveau des dendrites. A ce niveau, ce n'est plus la dynéine qui assure le transport le long des microtubules, mais la kinésine, qui appartient à la même famille de protéines motrices. L'inactivation de la kinésine dans les mélanocytes empêche le transfert des mélanosomes dans les dendrites (Hara, Yaar et al. 2000). Au niveau des extrémités des dendrites, la protéine Rab 27a, associée à la membrane des mélanosomes va permettre la liaison d'une part avec la myosine Va. Celle-ci, présente dans les mélanosomes tardifs, intervient dans le transfert des organelles sur les filaments d'actine à l'extrémité des dendrites, agissant ainsi dans le transfert vers les kératinocytes (Wu, Rao et al. 2001). Des mutations du gène MYO5A sont retrouvées dans le syndrome de Griscelli de type

1 (GS1). D'autre part, Rab 27a permet la liaison avec la mélanophiline (MLPH), qui est un intermédiaire nécessaire pour la liaison de la myosine Va avec les filaments d'actine (Strom, Hume et al. 2002). Les mutations du gène *SLAC2A* codant la MLPH sont liées au syndrome de Griscelli de type 3 (GS3). La liaison de l' α -MSH au récepteur MC1R participe à la régulation du transport des mélanosomes, en favorisant le développement des dendrites, et en augmentant l'accumulation de mélanosomes au niveau des extrémités des prolongements cellulaires. Cette régulation est obtenue par induction de l'expression du gène *RAB27A*, et en favorisant l'interaction de la mélanophiline avec les filaments d'actine. L' α -MSH n'intervient en revanche pas dans les interactions entre la Rab 27a avec la myosine Va et la MLPH (Passeron, Bahadoran et al. 2004).

4.6.3> Le transfert vers les kératinocytes

Le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes est obtenu par phagocytose. Quand la peau est exposée aux rayonnements ultraviolets, le nombre de mélanosomes qui sont transmis vers les kératinocytes augmente (Pawelek, Chakraborty et al. 1992), de même qu'après stimulation par l' α -MSH. Les mécanismes impliqués sont encore mal connus ; avec cependant un rôle de l' α -MSH dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines de l'exocytose (Virador, Muller et al. 2002). Seiberg et al. ont identifié à la surface des kératinocytes, un récepteur : PAR-2 (Protease Activator Receptor 2) à sept domaines transmembranaires couplé une protéine G indispensable à l'intégration des mélanosomes. L'activation du récepteur est obtenue par clivage protéolytique (Arg-Ser) du domaine extracellulaire. PAR-2 possède un rôle prépondérant dans la pigmentation, car son inhibition spécifique dans la peau entraîne une dépigmentation. Son rôle mal défini est vraisemblablement lié à la présence de tyrosine qui favorise son activation (Seiberg, Paine et al. 2000). Les rayonnements UV contrôlent également l'expression du gène *PAR2* et permettent donc d'augmenter la phagocytose (Boissy 2003). Enfin, l'analyse de l'incorporation de microsphères, selon le type de peau claire ou foncée, montre que l'incorporation des mélanosomes est plus efficace dans les peaux foncées que dans les peaux claires. Cette différence est probablement due au fait que le niveau d'expression de *PAR2*, ainsi que le niveau de tyrosine sont fonction du type de peau, avec un niveau plus élevé dans les peaux foncées. Le récepteur PAR-2 pourrait donc au même titre que le récepteur MC1R et la protéine tyrosinase permettre d'expliquer les différences de pigmentation inter-ethniques (Babiarz-Magee, Chen et al. 2004).

protéine	chromosome humain	locus murin	locus humain	mutation phénotype	fonction chez l'homme	OMIM#
protéines mélanosomales						
tyrosinase	<i>TYR</i>	<i>albino</i>	11q14-q21	OCA1	oxydation de la tyrosine, de la DOPA, du DHI et du DHICA	606933
TRP-1	<i>TRP1</i>	<i>brown</i>	9p23	OCA3	stabilisation de l'activité tyrosinase	203290
Dct/TRP-2	<i>DCT</i>	<i>slaty</i>	13q31-q32	?	dopachrome tautomérase	191275
Pmel17	<i>PMEL17</i>	<i>silver</i>	12q13-q14	?	polmérisation du DHICA	155550
protéine P	<i>P gene</i>	<i>pinkeyed diluted</i>	15q11.2-q12	OCA2	élévation du pH intramélanosomal	203200
AIM-1 (ou MATP)	<i>MATP</i>	<i>underwhite</i>	5p13.3	OCA4	homologie avec des transporteurs de sucre	606574
Lyst	<i>LYST</i>	<i>beige</i>	1q42.1-42.2	CHS	transport des protéines mélanosomales	214500
protéines signal						
ASIP	<i>ASIP</i>	<i>agouti</i>	20q11.2-q12	?	antagoniste de MC1R	600201
MC1R	<i>MC1R</i>	<i>extension recessive yellow</i>	16q24.3	pigmentation mélanome	récepteur protéine G	155555
POMC (α -MSH, ACTH)	<i>POMC</i>	<i>Pomc1</i>	2q23.3	syndrome de Cushing	agoniste de MC1R	176830
OA1	<i>OA1</i>	<i>Oa1</i>	Xp22.3	OA1	récepteur protéine G	300500
Mitf	<i>MITF</i>	<i>mi</i>	3p12-p14.1	WS2a	facteur de transcription, régulation gènes de la pigmentation, différenciation mélanocytaire	193510
transport et transfert des mélanosomes						
myosine Va	<i>MYO5A</i>	<i>dilute</i>	15q21	GS1	protéine motrice	214450
Rab 27a	<i>RAB27A</i>	<i>ashen</i>	15q21	GS2	transport des mélanosomes	607624
Mlph	<i>SLAC2A</i>	<i>leaden</i>	2q37	GS3	interaction avec protéines Rab27	609227
transport des lysosomes						
Hps1	<i>HPS1</i>	<i>pale ear</i>	10q23.1	HPS1	protéine transmembranaire, synthèse organelles cytoplasmiques	604982
Hps2	<i>AP3B1</i>	<i>lrod</i>	5q14.1	HPS2	sous unité 1 du complex AP3, endocytose exocytose	608233
Hps3	<i>HPS3</i>	<i>cocoa</i>	3q24	HPS3	synthèse précoce et maturation des mélanosomes	606118
Hps4	<i>HPS4</i>	<i>light ear</i>	22q11.2-q12.2	HPS4	synthèse des organelles lysosomes BLOC1	606682
Hps5	<i>HPS5</i>	<i>maroon</i>	11p15-p13	HPS5	synthèse des organelles lysosomes BLOC2	607521
Hps6	<i>HPS6</i>	<i>ruby eye</i>	10q24.32	HPS6	synthèse des organelles lysosomes BLOC2	607522
Hps7	<i>DTNBP1</i>		6p22.3	HPS7	dystrobrevin binding protein, BLOC1	607145
PAR-2	<i>F2RL1</i>	<i>F2rl1</i>	5q13		récepteur protéine G, phagocytose des mélanosomes	600933
différenciation et migration des mélanocytes						
Pax 3	<i>PAX3</i>	<i>sploch</i>	2q35	WS1	facteur de transcription, régulation Mitf	193500
Sox 10	<i>SOX10</i>	<i>dominant megacolon</i>	22q13	WS4	facteur de transcription, régulation Mitf	277580
EDN3/EDNRB3	<i>EDN3/EDNRB</i>	<i>lethal spotting/ piebald</i>	20q13.2/13q22	WS4	ligand/récepteur protéine G	277580
Slug	<i>SNAI2</i>	<i>targeted null</i>	8q11	WS2d	facteur de transcription, différenciation mélanocytaire	608890
Kit	<i>KIT</i>	<i>dominant spotting</i>	4q12-q12	PBT	agoniste récepteur transmembranaire tyrosine kinase	172800

Tableau 2: Les gènes de la pigmentation (modifié d'après Sturm 2001 et Tomita 2004)

4.7> Conclusion

La pigmentation constitue la seule protection vraiment efficace de la peau contre les rayonnements ultraviolets, responsables de nombreux dommages de l'ADN et de protéines parfois critiques pour les cellules de l'épiderme. L'absence du pigment photoprotecteur favorise l'apparition de mutations de l'ADN dans les cellules de l'épiderme conduisant à des processus apoptotiques ou de cancérisation, avec le développement de mélanomes malins ou de carcinomes.

La régulation de la pigmentation constitutive, fait appel à un nombre considérable de voies et processus cellulaires. Elle se fait tout d'abord au niveau de la synthèse même des deux pigments : l'eumélanine et la phéomélanine. Cependant, celle-ci implique différents points critiques comme la biodisponibilité des différents substrats et enzymes nécessaires à la synthèse. Le contrôle de l'expression des différents gènes de la pigmentation par le facteur de transcription Mitf semble de ce point vu largement essentiel. De ce fait, l'activation plus ou moins efficace des voies cellulaires (AMPC, MAPK, PKC, PKG) par l'association des différents facteurs paracrines, sécrétés par les kératinocytes (α -MSH, EDN1, FGF2, SCF...), à leur récepteur respectif au niveau de la membrane des mélanocytes (MC1R, EDNRB, récepteur tyrosine, Kit...) est également indispensable au contrôle de la mélanogénèse. La pigmentation est aussi régulée au niveau de la synthèse des mélanosomes et dans leur transfert vers les kératinocytes. Au final, il existe un nombre considérable de facteurs qui interviennent dans le contrôle de la balance de la synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine, avec des interactions très étroites entre les différents protagonistes. Ces facteurs permettent d'expliquer les variations phénotypiques de la pigmentation, présentes chez l'homme et les animaux ; et leur association à différents syndromes génétiques pigmentaires (le mélanome, l'albinisme oculaire cutané (OCA), l'albinisme oculaire (OA), le syndrome de Griscelli (GS) (Sturm, Teasdale et al. 2001), le syndrome de Hermansky-Puldak (HPS), le syndrome de Waardenburg (WS) (Tomita and Suzuki 2004), le piebaldisme (PBT) (Syrris, Heathcote et al. 2002), le syndrome de Chediak-Higashi (CHS) (Zarzour, Kleta et al. 2005)).

Le tableau 2, présenté ci-contre, rassemble les facteurs impliqués dans la pigmentation, ainsi que les gènes associés dont les mutations sont responsables des différents syndromes de la pigmentation (*Tableau 2*).

1> L'épidémiologie du mélanome

En 1812, le médecin français René Laennec décrit pour la première fois en Europe un cas de mélanome. Il correspond à une lésion néoplasique des mélanocytes épidermiques. C'est un cancer fortement invasif et agressif accompagné d'un taux de mortalité élevé. Son incidence a augmenté rapidement ces dernières décennies avec une inflation de 3 à 7% par an dans les populations caucasiennes à peau claire, pour une croissance de 132% entre la période de 1979 et 1998. A l'heure actuelle, l'incidence des mélanomes progresse toujours en doublant tous les cinq ans contre tous les dix ans pour les autres cancers. Ainsi, le risque de développer un mélanome au cours de la vie est de 1 pour 90, avec un risque de mortalité de 1/400.

En ce qui concerne la France, l'incidence des mélanomes n'échappe pas à l'évolution mondiale, atteignant 7 pour 100000 avec 6000 à 7000 nouveaux cas par an. La France se situe parmi les zones mondiales assez fortement touchées mais encore loin des pays comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande ou les Etats-Unis. En France, l'incidence des mélanomes est variable selon les régions (*Figure 15*) avec une influence génétique évidente ainsi que les habitudes sociales d'exposition solaire. Le mélanome touche principalement les adultes et personnes âgées. Si il touche plutôt les femmes jeunes, il est plus fréquent chez les hommes âgés (*Figure 15*).

2> L'apparition du mélanome

Les mécanismes de cancérisation aboutissant à l'apparition d'un mélanome sont liés au dérèglement des mélanocytes de l'épiderme, qui perdent leur caractère différencié et qui prolifèrent anormalement, conduisant à la formation de tumeurs. Pour comprendre ces mécanismes, il est important dans un premier temps de connaître les étapes et les facteurs qui interviennent dans la mise en place des mélanocytes au niveau de l'épiderme.

2.1> La différenciation des mélanocytes

Les mélanocytes dérivent d'une population transitoire de cellules pluripotentes de la crête neurale : les pré-mélanoblastes (*Figure 16-a*). Ces cellules reçoivent différents signaux de l'environnement qui vont déterminer leur différenciation en mélanoblastes, puis leur migration vers la couche basale de l'épiderme où les cellules seront alors transformées en mélanocytes. Les mélanoblastes sont des cellules pluripotentes non différenciées qui sont capables de proliférer et qui sont à l'origine de différents types cellulaires,

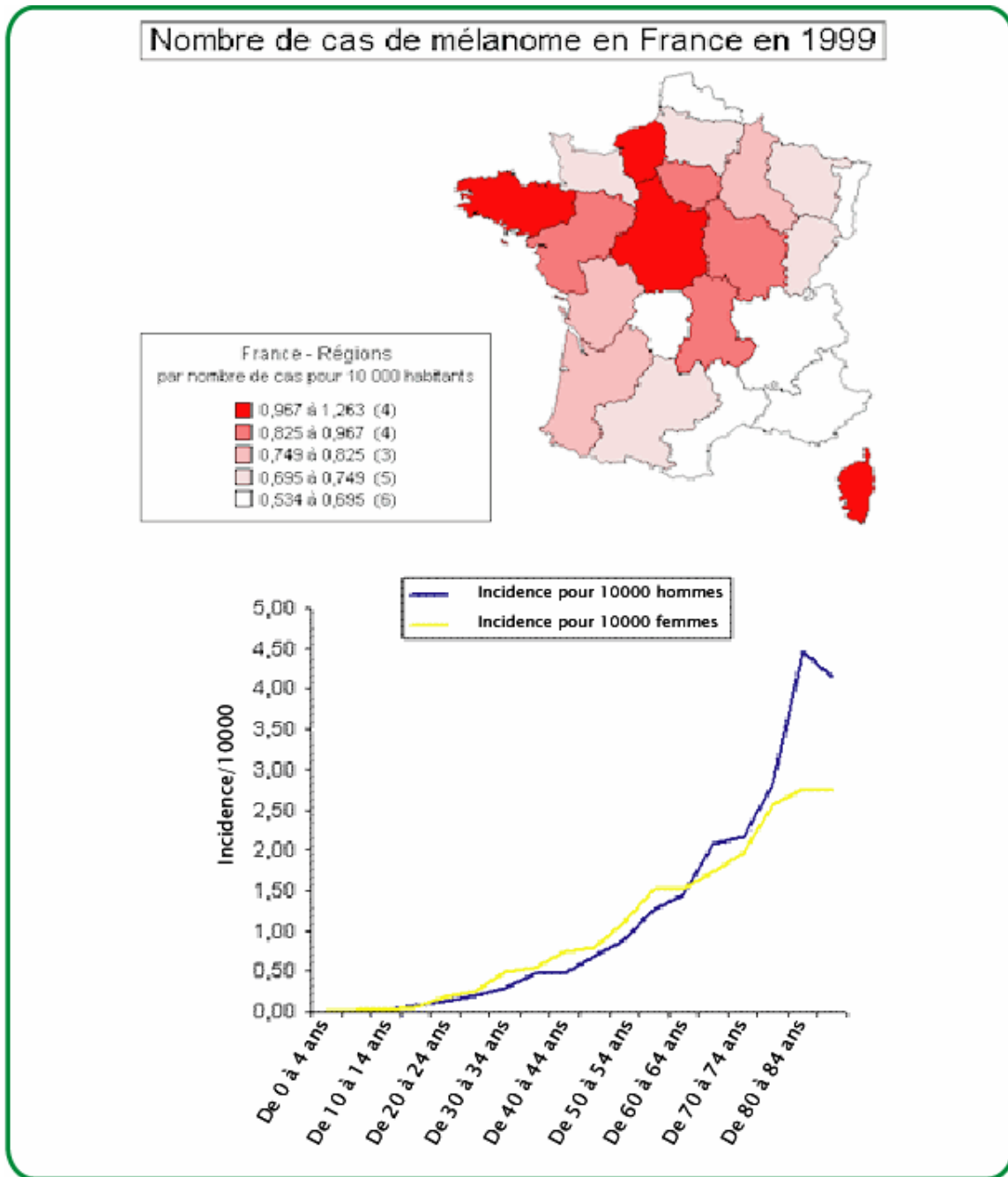


Figure 15: Incidence du mélanome en France (1999)

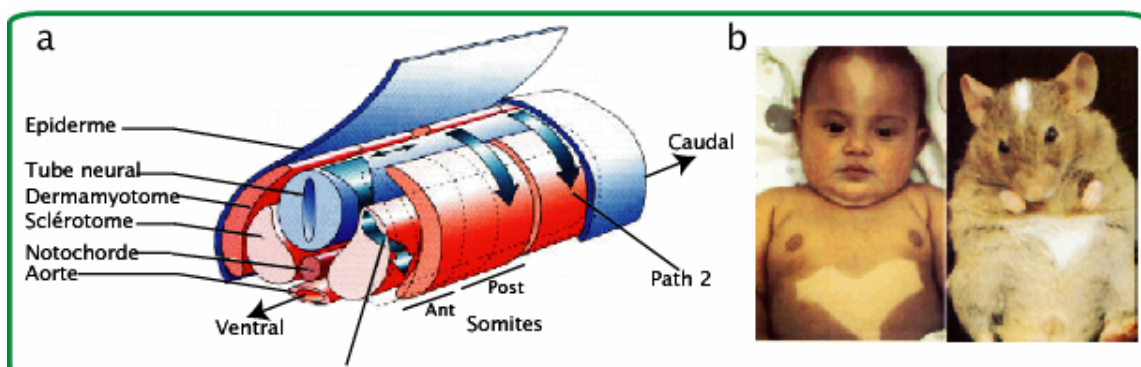


Figure 16: Migration et différenciation des mélanocytes

incluant les neurones et cellules gliales du système nerveux périphérique, les cellules osseuses du cartilage du squelette de la tête, et pour finir les mélanocytes (Le Douarin and Dupin 2003). Les mélanoblastes migrent selon des voies caractéristiques vers l'épiderme, l'oreille interne, et la choroïde de l'œil. A ce stade, la mélanogénèse n'est pas encore déclenchée. Les mélanocytes à l'inverse, sont des cellules spécialisées non prolifératives capables de se pigmenter.

Le facteur de transcription Mitf, qui est régulé de manière très précise au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (cf. § Le rôle du facteur de transcription Mitf, page 52) intervient dans la différenciation et la migration des mélanocytes, en induisant l'expression de gènes spécifiques du type cellulaire (*TYR*, *TRP1*, *DCT...*), ou en contrôlant l'expression de facteur impliqué dans l'organisation du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire (*SLUG*). Mitf intervient aussi dans la régulation de la morphologie des mélanocytes, avec le développement des dendrites.

Mitf est impliqué dans la survie des mélanoblastes et des mélanocytes en inhibant l'apoptose par l'induction de l'expression du facteur anti-apoptotique BCL2. Mitf jouerait également un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire des mélanocytes, par l'intermédiaire des facteurs de transcription Tbx2 (Carreira, Liu et al. 2000) et Brn-2 décrits comme jouant respectivement un rôle inhibiteur de la sénescence cellulaire et activateur de la prolifération, ou par le contrôle de l'expression de *CDKN1A* (Carreira, Goodall et al. 2005). Enfin, l'activité de régulation transcriptionnelle du facteur Mitf est contrôlée par deux voies opposées, la voie pro-proliférative des MAPK (Busca and Ballotti 2000) et la voie de réponse au stress de la kinase p38 à tendance anti-proliférative (Mansky, Sankar et al. 2002).

Du fait des fonctions complexes et controversées de Mitf, il est clair que les mécanismes de régulation de l'expression et d'activation du facteur sont essentiels pour le contrôle de la différenciation mélanocytaire.

L'apparition d'un mélanome est observée dès que les cellules ne sont plus capables de réguler correctement le cycle cellulaire. Premièrement, dans 70% des mélanomes les gènes *BRAF* ou *NRAS* sont mutés conduisant à l'activation de manière constitutive et anormale de la voie des MAPK. Ainsi, le facteur de transcription Mitf va être entraîné de manière préférentielle vers la dégradation par le système protéasome, et ne pourra alors pas jouer son rôle clé d'activateur de la transcription. Deuxièmement, dans 30% des mélanomes, la voie Wnt est contournée et conduit à une stabilisation de la β -caténine, qui entraîne la dérégulation

de l'expression de *MITF* contrôlée par le couple de facteurs β -caténine-LEF/TCF, mais aussi de l'oncogène *MYC* ou de la cycline D1.

Les mécanismes de régulation du développement et de la différenciation mélanocytaire font appel à un nombre considérable de facteurs et de voies d'activation qui doivent être contrôlées très précisément pour maintenir le caractère différencié des mélanocytes. Cependant, la limite à franchir est très proche pour que le dérèglement de l'une de ces voies conduise au mécanisme de cancérisation cutanée. De la même manière que le facteur de transcription *Mitf* joue un rôle clé dans le contrôle de la mélanogénèse, il semble également essentiel pour la régulation des mécanismes de différenciation mélanocytaire et de cancérisation.

2.2> Les différents stades du développement

2.2.1> Généralités

L'hypothèse de la carcinogénèse à étapes multiples permet de distinguer trois stades dans le développement d'une tumeur : l'**initiation**, la **promotion** et la **progression**.

L'**initiation** est un processus irréversible qui altère une cellule, lui conférant le potentiel de croissance continue en échappant aux différents contrôles. Ces cellules présentent un avantage sélectif de croissance par rapport aux cellules normales mais ce potentiel se révèle dans l'étape suivante de la carcinogénèse, la promotion.

La **promotion** est le stade d'établissement d'une cellule altérée en un clone caractérisé par sa faculté à se diviser plus rapidement que les cellules normales. Les carcinogènes bien que souvent "complets" (capables d'induire aussi bien l'initiation que la promotion), nécessitent parfois l'effet additif d'agents promoteurs, dont la propriété commune est la capacité à stimuler la division cellulaire. La réponse initiale à l'initiation et la promotion est un néoplasme bénin tel un papillome cutané ou un naevus mélanocytaire bénin. Ainsi, l'accumulation des mutations favorisée par l'action d'un carcinogène conduit au phénotype transformé de la cellule. Enfin, c'est à cette étape ultime que s'associe également le phénomène d'immunosuppression, qui se définit par une diminution spécifique de la réponse immunitaire contre les tumeurs, engendrée par l'absence de développement des cellules effectrices cytotoxiques qui sont capables de reconnaître et lyser la tumeur.

2.2.2> Les différentes étapes de la carcinogénèse mélanocytaire

Le mélanome peut être considéré comme un dérèglement de l'homéostasie des mélanocytes qui entraîne le démarrage de leur prolifération. Celle-ci est normalement régulée

par un ensemble de facteurs environnementaux, génétiques, épistatiques qui permet le maintien des mélanocytes sous forme différenciée et qui contrôle leur prolifération. Les cinq différents stades aboutissant d'une part au mélanome primitif puis d'autre part au mélanome métastatique, sont les suivants (*Figure 17*) (Meier, Satyamoorthy et al. 1998) :

Le naevus commun

Lors d'un blocage de la différenciation ou de la migration, les mélanocytes peuvent se retrouver sous la forme de cellules rondes groupées à la jonction épidermique ou dans le derme pour former les naevi, dont seulement 20% vont donner des mélanomes. De telles lésions peuvent rester complètement stables pendant des années ou bien évoluer au sein d'amas dans l'épiderme, qui migrent ensuite dans le derme. L'hypothèse d'Elder en 1984 propose que le naevus commun constitue la réponse aux étapes d'initiation et de promotion à un stimulus carcinogénique, considéré comme étant les ultraviolets. Cependant, les mélanomes surviennent rarement directement d'un naevus commun mais nécessitent une étape intermédiaire représentée par le naevus dysplasique ou atypique (*Figure 17*).

Le naevus dysplasique ou atypique

Le naevus dysplasique est en général plus grand que le naevus commun, avec une structure moins ordonnée, et des bords moins réguliers. Il se développe généralement chez le jeune adulte, bien que des lésions peuvent apparaître tout au long de la vie. Les naevi atypiques sont préférentiellement retrouvés au niveau des zones du corps exposées au soleil, ce sont des lésions bénignes et la plupart restent cliniquement stable. La densité des naevi dysplasiques constitue un marqueur de risque pour le mélanome (cf. § Les facteurs influençant l'apparition d'un mélanome, page 89) (Autier, Boniol et al. 2004), qui dépend aussi d'autres facteurs phénotypiques (couleur de la peau...) mais aussi génotypiques. Cependant, bien que la plupart de ces lésions soient stable, 25% des mélanomes proviennent d'un naevus dysplasique précurseur (*Figure 17*). De plus, parmi les mélanomes survenant dans un contexte familial, 70% des mélanomes primitifs sont associés à des naevi préexistants. Dans ces naevi dysplasiques, quelques unes de ces mutations (dont *BRAF/NRAS*) peuvent ainsi contribuer au "phénotype tumoral" (*Figure 17*).

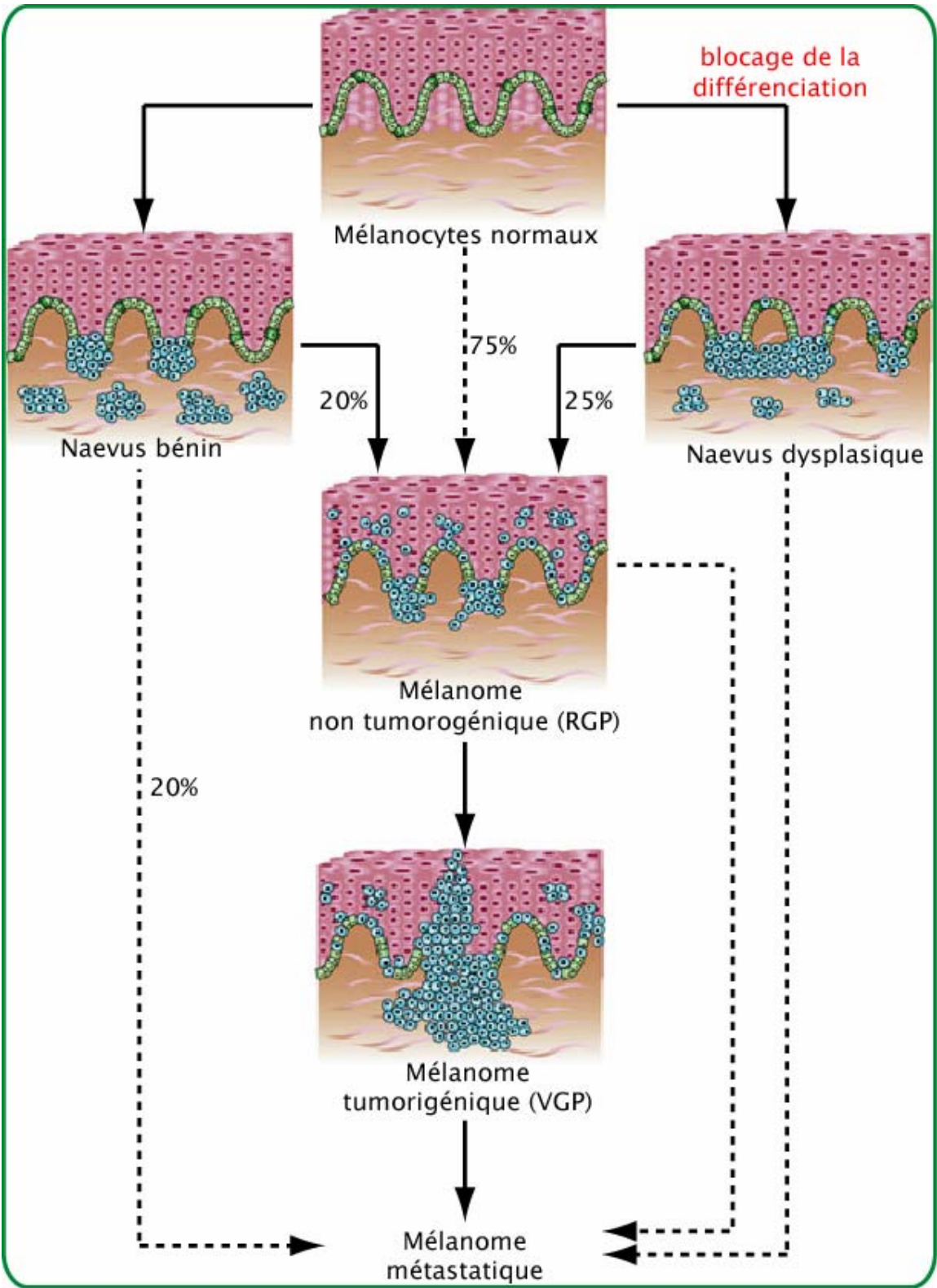


Figure 17: Développement et progression du mélanome (selon le modèle de Clark, Elder et Guerry)

Le mélanome en phase d'expansion radiale (RGP)

Les mélanomes en phase d'expansion radiale sont situés dans l'épiderme, ou s'étendent sous forme de petits amas ou de cellules individuelles dans le derme papillaire par un processus appelé "microinvasion". Il n'existe cependant pas de véritable masse tumorale proprement dite. Ces lésions semblent adaptées pour une croissance autonome au niveau de l'épiderme et pour y survivre, mais pas pour progresser dans le derme. La phase d'expansion radiale est caractérisée par une croissance autonome et progressive des cellules qui n'ont pas la capacité de métastaser. La lésion est une tache qui s'étend en périphérie de façon centrifuge et irrégulière (*Figure 17*). Un fort pourcentage de ces lésions microinvasives, qui accumulent des mutations de l'ADN ainsi que des propriétés phénotypiques tumorales, évolue vers une phase tumorigénique. Cependant, une telle progression peut survenir assez longtemps (des mois voire des années) après l'apparition de la phase d'expansion radiale. Ces lésions ne métastasent pas et le risque de récurrence est quasiment nul après exérèse chirurgicale.

Le mélanome en phase d'expansion verticale (VGP)

Cette phase tumorale est définie par rapport à l'acquisition de nouvelles propriétés du mélanome, caractérisé par l'apparition d'un nodule expansif au niveau de la plaque en phase radiale s'étendant en surface, et qui pointe vers l'extérieur, perpendiculairement à la surface de la peau (*Figure 17*). Cette phase est cliniquement importante puisqu'elle correspond à l'apparition d'une masse tumorale qui annonce le développement d'un néoplasme potentiellement métastatique. A mesure que la lésion s'élargit et s'épaissit le nombre de facteurs de risques augmente : l'ulcération, l'invasion de niveau IV et V, un taux mitotique élevé...L'acquisition de ces propriétés est la conséquence d'anomalies génétiques accumulées par les cellules du fait d'une instabilité croissante. Le mélanome en phase verticale de croissance présente 10 à 15% de risques de métastaser quelle que soit son épaisseur jusqu'à 1,5 mm, et ce risque augmente progressivement avec l'épaisseur.

2.2.3> Les métastases

Du point de vue biologique, il y a un nombre important de composants de la peau qui influencent le développement de la tumeur. Ceux-ci incluent les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et inflammatoires qui interviennent dans le contrôle de l'homéostasie des mélanocytes. En exprimant un nombre important de molécules de surface, les mélanocytes peuvent adhérer, migrer et survivre au niveau de la couche basale.

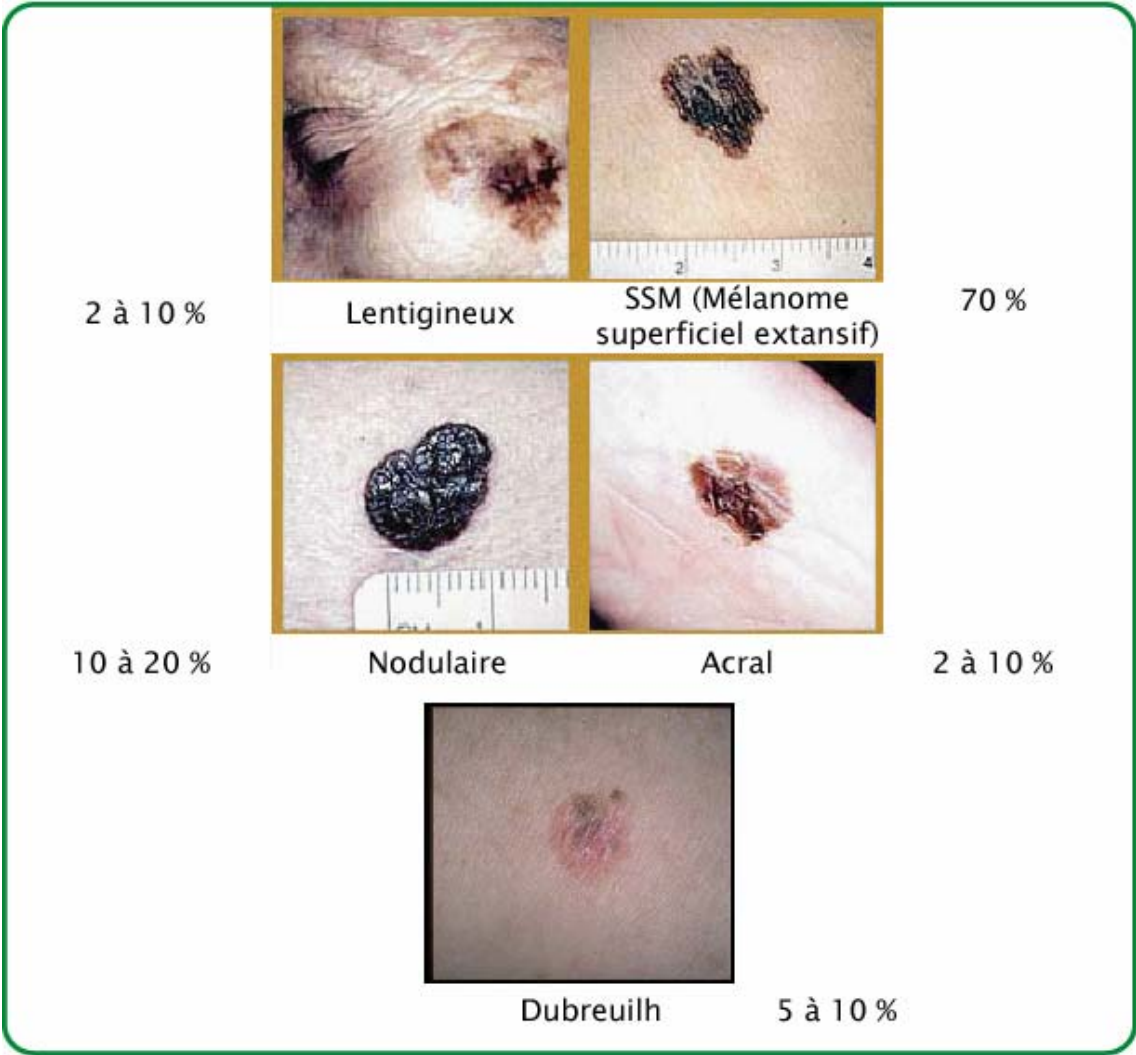


Figure 18: Différents types de mélanomes

Les cadhérines, qui sont des glycoprotéines de surface sont normalement exprimées dans la peau. La E-cadhérine, est exprimée par les mélanocytes et les kératinocytes, et empêche les mélanocytes de se diviser. Par contre, la N-cadhérine est exprimée dans les fibroblastes, et les cellules endothéliales. Au cours du développement d'un mélanome, sous l'influence de différents signaux cellulaires, l'expression de la E-cadhérine est progressivement perdue au profit d'une expression de la N-cadhérine. Ceci a pour conséquences de favoriser l'interaction des cellules de mélanome avec les fibroblastes et les cellules endothéliales et donc de favoriser leur progression dans le derme. Parallèlement, une perte des dendrites et des jonctions de type "gap" sont observées, favorisant la migration cellulaire. Enfin, la sécrétion de nombreux facteurs paracrines va participer à la promotion de la progression du mélanome (Herlyn, Berking et al. 2000).

2.3> Les différents types de mélanomes

2.3.1> Généralités

Il existe différents types de mélanomes avec des fréquences et des agressivités variables (*Figure 18*). Seuls les plus importants seront exposés.

Le mélanome à extension superficielle (SSM = Superficial Spreading Melanoma)

Le SSM représente 70% des mélanomes. Il touche le sujet jeune et se développe au niveau de zones cutanées exposées au soleil (jambes chez la femme, poitrine et dos chez l'homme). Il apparaît à tout âge après la puberté, souvent entre 30 et 50 ans. Initialement, c'est une petite tache pigmentée brune ou noire de 5 à 10 mm de diamètre, asymétrique, irrégulière. Au delà de 10 mm, apparaissent des plages bleutées, grises ou roses et des zones pigmentées qui lui confèrent un aspect caractéristique de lésion polychrome à contours irréguliers, en carte de géographie. Cette tache brune foncée est souvent confondue au début avec un nævus pigmentaire bénin mais certains signes le distinguent (transformation ou extension récente remarquée par le patient, modification de taille, de couleur, d'aspect, de consistance, de forme, irrégularité des bords, polychromie de la lésion). C'est en général lorsque le diamètre atteint 15 à 35 mm qu'un nodule apparaît traduisant l'infiltration du derme.

Le Mélanome de Dubreuilh (LMM = lentigo malignant melanoma)

Le mélanome de Dubreuilh représente 5 à 10% des mélanomes, et constitue la forme la moins grave. Il se développe chez les sujets âgés, au niveau des zones cutanées exposées au soleil, principalement le visage. C'est une grande tache sans signe fonctionnel, de 2 à 6 cm, plane, brune ou de coloration halée, avec des points de pigmentation plus foncés,

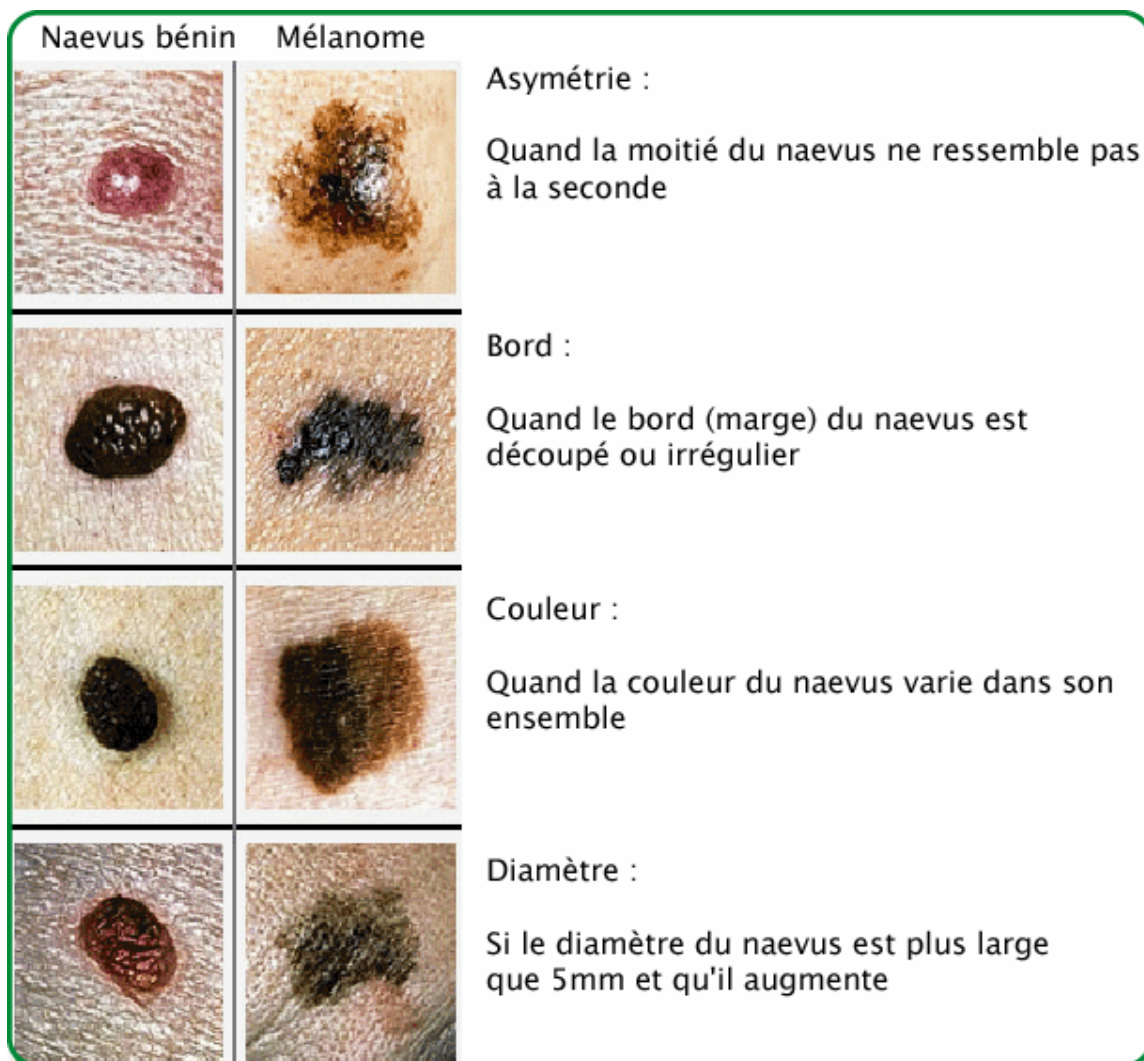


Figure 19: Critères ABCDE du mélanome

irrégulièrement disposés à sa surface, qui peut s'étendre progressivement. La malignité est purement locale. Après une dizaine d'années, un nodule invasif peut se constituer. Dans le lentigo malin, les mélanocytes restent localisés dans l'épiderme. Lorsque le mélanome malin se développe sur la mélanose, les mélanocytes cancéreux envahissent le derme. Le risque de transformation de lentigos malins en mélanomes malins est de 30 à 40%. L'excision précoce est recommandée avant l'envahissement et constitue un traitement efficace.

Le mélanome nodulaire

Le mélanome nodulaire est une forme agressive qui représente 10 à 20% des mélanomes. Il se caractérise en effet par une progression verticale immédiate de la tumeur, propice à l'échappement de cellules tumorales. Le pronostic est plus défavorable car l'épaisseur de la lésion est d'emblée élevée. Il survient à tout âge (20-60 ans) sur un nævus préexistant ou sur une peau saine. Il forme un nodule noir de croissance rapide, devenant vite bourgeonnant et hémorragique.

Le mélanome acral lentigineux : ALM

L'ALM se développe au niveau des extrémités, il est rare avec 2 à 10 % en Europe et aux USA. Il est plus fréquent chez les individus négroïdes et orientaux, atteignant 30 à 60 % au Japon. Il apparaît à l'âge moyen (50 à 60 ans) et siège au niveau de la région plantaire, sur le lit et le pourtour de l'ongle. Il représente 50 % des mélanomes du pied. L'ALM débute par une macule brun-noir qui forme en quelques mois ou années une plaque pigmentée de 2 à 3 cm, aux bords déchiquetés avec des plages achromiques. Plus tardivement, apparaissent sur la tache soit un nodule soit une ulcération. Autour de l'ongle c'est le panaris mélanique de Hutchinson qui peut débiter par une coloration noirâtre, longitudinale de la tablette unguéale. Sur le plan histologique : il présente deux caractéristiques, la présence de mélanocytes atypiques à très longues dendrites et un épiderme hyperkératosique.

Le mélanome des muqueuses

Le mélanome des muqueuses est rare. Il est plus fréquent chez les individus négroïdes ou asiatiques, et est localisé au niveau des muqueuses buccales, nasales, œsophagiennes, trachéales et vaginales. Le diagnostic est difficile et le pronostic est sombre.

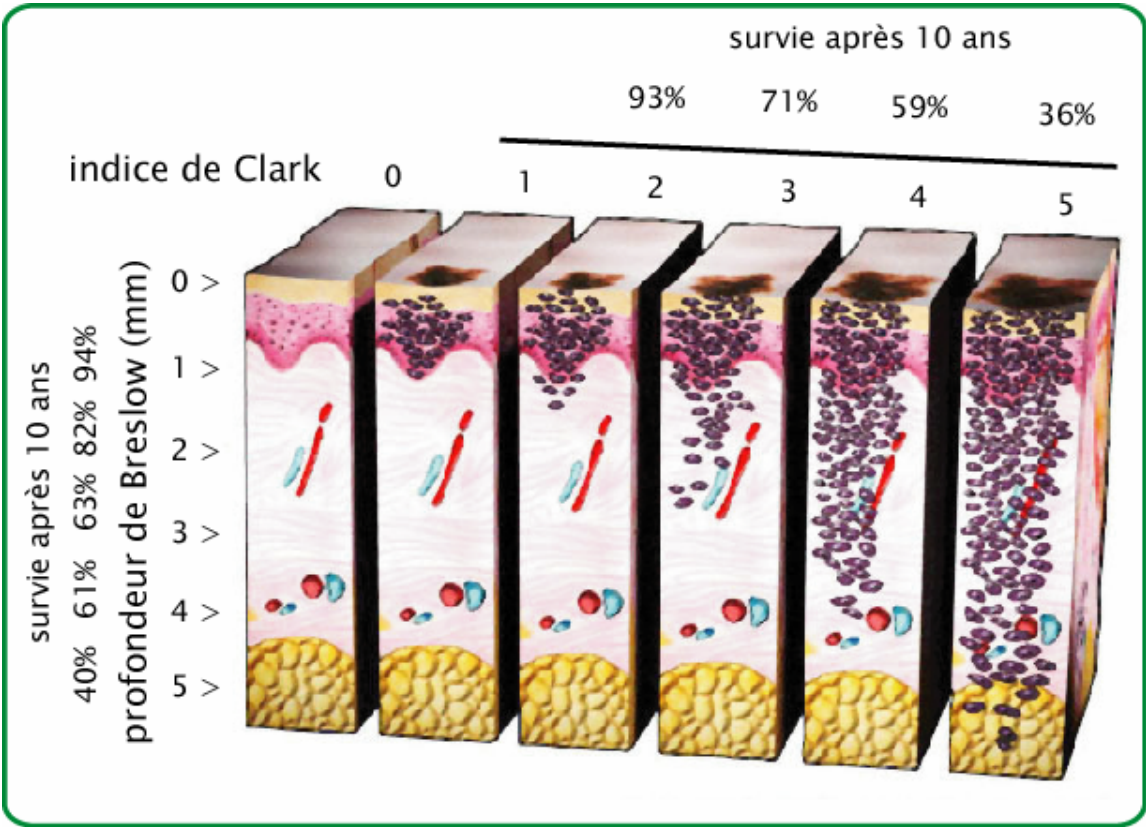


Figure 20: Indices de Breslow et de Clark

2.3.2> Les critères histopronostiques

La classification ABCDE

L'absence de traitement efficace en dehors de l'exérèse cutanée au stade précoce nécessite un dépistage efficace des mélanomes. Pour cela, la règle dite de l'abécédaire permet de reconnaître certains naevi (grains de beauté) dits "atypiques" et qui sont susceptibles de dégénérer en mélanome. Cette règle ne peut s'appliquer à tous les grains de beauté et certains, ne correspondant pas à cette classification, ne peuvent pour autant pas conduire à l'apparition d'un mélanome. Grâce aux différents critères de l'abécédaire du mélanome (Polsky 2005), il est cependant possible de définir les naevi à risque (*Figure 19*) :

A = Asymétrique ; si l'on trace un trait imaginaire au milieu du grain de beauté, les deux parties n'ont pas la même forme.

B = Bords irréguliers ; les bords ne sont pas nets, comme une carte de géographie.

C = Couleurs différentes ; le grain de beauté a plusieurs couleurs (brun clair, brun foncé, rosé...).

D = Diamètre supérieur à 6 millimètres (la taille approximative d'une gomme de crayon).

Le fait d'avoir de multiples grains de beauté "atypiques" augmente considérablement le risque d'avoir un mélanome et il convient dans ce cas de respecter scrupuleusement les règles de protection solaire.

Si les critères ABCD ne s'appliquent qu'à un type particulier de grain de beauté, on peut y ajouter une dernière lettre valable pour tout naevus :

E= Evolution ; c'est un critère majeur : toute tache ou bouton qui se modifie doit amener à consulter.

L'indice de Breslow

L'indice de Breslow est encore l'indicateur pronostique le plus important. C'est une méthode objective et reproductible qui consiste à mesurer verticalement au micromètre oculaire l'épaisseur de la lésion depuis la couche granuleuse de l'épiderme jusqu'à la cellule tumorale la plus profonde (*Figure 20*). Il existe une corrélation entre l'épaisseur de la tumeur et la survie des patients. Le risque de métastase peut être estimé à partir de la profondeur de l'invasion :

épaisseur du mélanome:

< à 0,76 mm = 0% de métastase

de 0,76 à 1,5 mm = 30%

de 1,51 à 2,25 mm = 33%

de 2,26 à 3 mm = 69%

à 3 mm = 84%

Les niveaux de Clark

L'indice de Clark permet d'évaluer le pronostic du mélanome en fonction du niveau d'invasion du derme (Figure 20). Il existe cinq niveaux distincts :

niveau I : lésion strictement limitée à l'épiderme. C'est un mélanome malin *in situ*. C'est à ce niveau qu'il devrait être retiré.

niveau II : la tumeur envahit partiellement le derme papillaire

niveau III : la tumeur comble le derme papillaire

niveau IV : la tumeur envahit le derme réticulaire

niveau V : la tumeur infiltre le tissu adipeux.

La classification TNM

La classification TNM correspond à une méthode systématique utilisée pour décrire la taille, l'emplacement et l'étendue d'une tumeur. La lettre T (de l'anglais «tumor», tumeur) s'applique à la taille, à l'emplacement de la tumeur primitive et prend en compte l'état d'ulcération de la lésion. La lettre N («node», ganglion) indique si des cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques qui drainent des liquides dans la partie du corps où est située la tumeur. La lettre M («métastase», métastase) indique si le cancer s'est propagé à d'autres régions de l'organisme.

2.4> Les facteurs influençant l'apparition d'un mélanome

Dans les pathologies cancéreuses, les facteurs génétiques et environnementaux participent largement au développement de la pathologie.

2.4.1> Les facteurs environnementaux

Un ensemble d'arguments expérimentaux et épidémiologiques montre que le rayonnement solaire est un facteur important dans la constitution du mélanome. Le plus fort taux d'incidence du mélanome se trouve dans le Queensland en Australie où il est quatre fois plus élevé qu'aux USA, lui-même deux fois plus élevé qu'au Canada et trois fois plus élevé qu'au Royaume-Uni. La latitude détermine la quantité de rayons ultra-violets. Ainsi, l'importance de la latitude de résidence durant l'enfance détermine le risque de développer un mélanome tardif. Ceci a été confirmé à de nombreuses reprises chez les immigrants aux USA, les Anglais installés en Australie, les Européens installés en Israël où pour une même population les risques varient selon la latitude (Jhappan, Noonan et al. 2003).

D'autres facteurs (l'altitude, la topographie locale, la couverture nuageuse, le brouillard, les particules en suspension, la pollution de l'atmosphère, la réduction de la couche d'ozone) peuvent également participer au développement de la pathologie et jouer un rôle non négligeable (Godar 2005).

L'une des causes de l'augmentation importante de la fréquence des mélanomes est liée à des changements dans les habitudes sociales et comportementales vis-à-vis de l'exposition solaire. Globalement, bronzer et présenter une peau brune constituent une nouvelle habitude adoptée par tous, pouvant même faire parti des pré requis à une bonne intégration sociale. Ce phénomène est d'autant plus accentué ces dernières années du fait de la généralisation des vacances, et de l'apparition de plus en plus fréquente des cabines solaires. C'est ainsi, que les Hommes sont actuellement exposés à des doses de plus en plus importantes, variant selon les habitudes d'être à l'intérieur (3% des radiations UV annuelles terrestres) ou à l'extérieur (10% des radiations UV annuelles terrestres), selon la saison, ou encore selon les habitudes de protections (Godar 2005). L'augmentation de la fréquence des mélanomes souffre également des fausses idées que se fait la population par rapport aux comportements à adopter vis-à-vis du soleil : à savoir que le soleil prépare la peau pendant la petite enfance, ou que les érythèmes chez l'enfant n'ont pas de conséquences graves s'ils sont correctement traités. A l'inverse, l'exposition solaire au cours de la petite enfance constitue à l'âge adulte un facteur de risque significatif dans le développement d'un mélanome. Une étude réalisée en Belgique, en Allemagne et en France entre 1991 et 1992, à partir de 412 mélanomes et 445 contrôles, a montré que l'exposition solaire pendant l'âge adulte si elle était associée à une exposition

solaire pendant l'enfance augmentait significativement le risque de mélanome, en comparaison avec l'exposition exclusive pendant l'âge adulte (Autier and Dore 1998).

Ainsi, l'exposition solaire constitue le facteur de risque environnemental le plus important pour le mélanome malin cutané (cf. § L'influence des rayonnements UV, page 32). L'utilisation de modèles animaux semble constituer une des perspectives pour l'étude des mécanismes de cancérisation cutanée aboutissant à l'apparition de mélanomes, avec notamment l'influence des UV ; même si le mélanome humain diffère largement de ceux développés chez l'animal. Ainsi, les modèles animaux, répondant aux irradiations UV ont été utilisés pour l'étude des mécanismes de cancérisation (Jhappan, Noonan et al. 2003). Un des premiers modèles étudiés est le poisson des mers froides (*Xiphophorus Xiphophorus*) qui croisé avec une autre souche développe de manière spontanée ou après induction UV, des mélanomes. De même, l'opposum d'Amérique du Sud est particulièrement utilisé en photobiologie, du fait qu'il utilise les systèmes de réparation photo-inductibles pour éliminer les dimères. Par manipulation de ces systèmes, il est ainsi possible d'étudier les mécanismes de réparation. Enfin, la souris constitue un modèle animal intéressant pour l'étude du mélanome malin notamment pour l'identification des facteurs génétiques par l'utilisation des souris invalidées. De plus, un nombre important de souris immunodéficientes est disponible pour l'étude par transplantation ou injection de mélanome. Ainsi, l'utilisation des modèles murins a permis d'identifier certaines des voies cellulaires, des facteurs paracrines, ou encore les gènes impliqués dans le développement des mélanomes. L'ensemble de ces modèles est donc essentiel pour la compréhension de la cancérogenèse cutanée.

2.4.2> Les facteurs d'hôtes constitutionnels

Les facteurs d'hôtes constitutionnels sont spécifiques de chaque individu et vont définir pour chacun une sensibilité de réponse aux rayonnements ultraviolets, ainsi qu'un risque plus ou moins grand de développer un mélanome. Il existe au moins cinq facteurs d'hôtes indépendants : la couleur des cheveux, la couleur des yeux, le phototype cutané et l'apparition de lésions de type éphélide (taches de rousseur) et naevus. Ces caractères phénotypiques sont plus ou moins liés dans la mesure où ils ont des origines biochimiques ou génétiques communes.

L'influence des phototypes

Le développement des mélanomes est influencé par le phototype de la peau (I à IV). En effet, les peaux claires ont un risque beaucoup plus élevé de développer un mélanome que les peaux foncées. Comme, il a été décrit précédemment, la couleur de la peau et donc les phototypes sont définis par de nombreux facteurs et gènes, avec notamment les variants du gène *MC1R* (cf. § MC1R, page 43) et de *TYR*, à l'origine des différences de phénotypes et de susceptibilité au mélanome. Pour chaque phototype, va correspondre une DEM (ou Dose Erythémale Minimale), qui est la dose en J/m² permettant d'obtenir un érythème juste perceptible 24 heures après UV, et qui de 150 à 1500 J/m² entre une peau très claire et très foncée.

Le nombre de naevi

Le nombre de naevi est un bon facteur pronostic de l'apparition de mélanome chez l'adulte. L'augmentation de la densité de naevus est maximale avant l'âge de 15 ans. Dès 30-35 ans, le nombre est stabilisé et commence à décroître. Le développement du naevus est déterminé génétiquement, mais l'exposition solaire est nécessaire pour une expression phénotypique du génome du naevus. Une étude réalisée sur 628 enfants de 6 à 7 ans, d'Allemagne, de France, de Belgique et d'Italie, a permis d'établir qu'il existe une variabilité sexe dépendante dans la taille et la répartition des naevi sur le corps. Après ajustement des facteurs d'environnement (exposition et protection solaire), les résultats montrent que les garçons présentent 7% de petits naevi et 6% de larges, supplémentaires par rapport aux filles (Autier, Boniol et al. 2004). Le nombre de petits naevi est de 17% supérieur au niveau de la tête, du cou, des épaules et du tronc chez les garçons. A l'inverse, ce nombre est diminué de 8% au niveau des membres surtout inférieurs (Autier, Boniol et al. 2004). Les différences de répartitions des naevi, observées chez l'enfant, peuvent permettre de comprendre les variations de susceptibilité et de localisation des mélanomes entre les hommes et les femmes.

Le déficit immunitaire

Les déficits immunitaires semblent favoriser la genèse des mélanomes. Ainsi, les patients ayant subi une greffe rénale présentent un risque accru de cancers cutanés (4 à 5 fois supérieur). Les traitements chimiothérapeutiques immunosuppresseurs, les déficits immunitaires congénitaux, la dialyse chronique, les maladies immunosuppressives (SIDA...) augmentent le risque de mélanome.

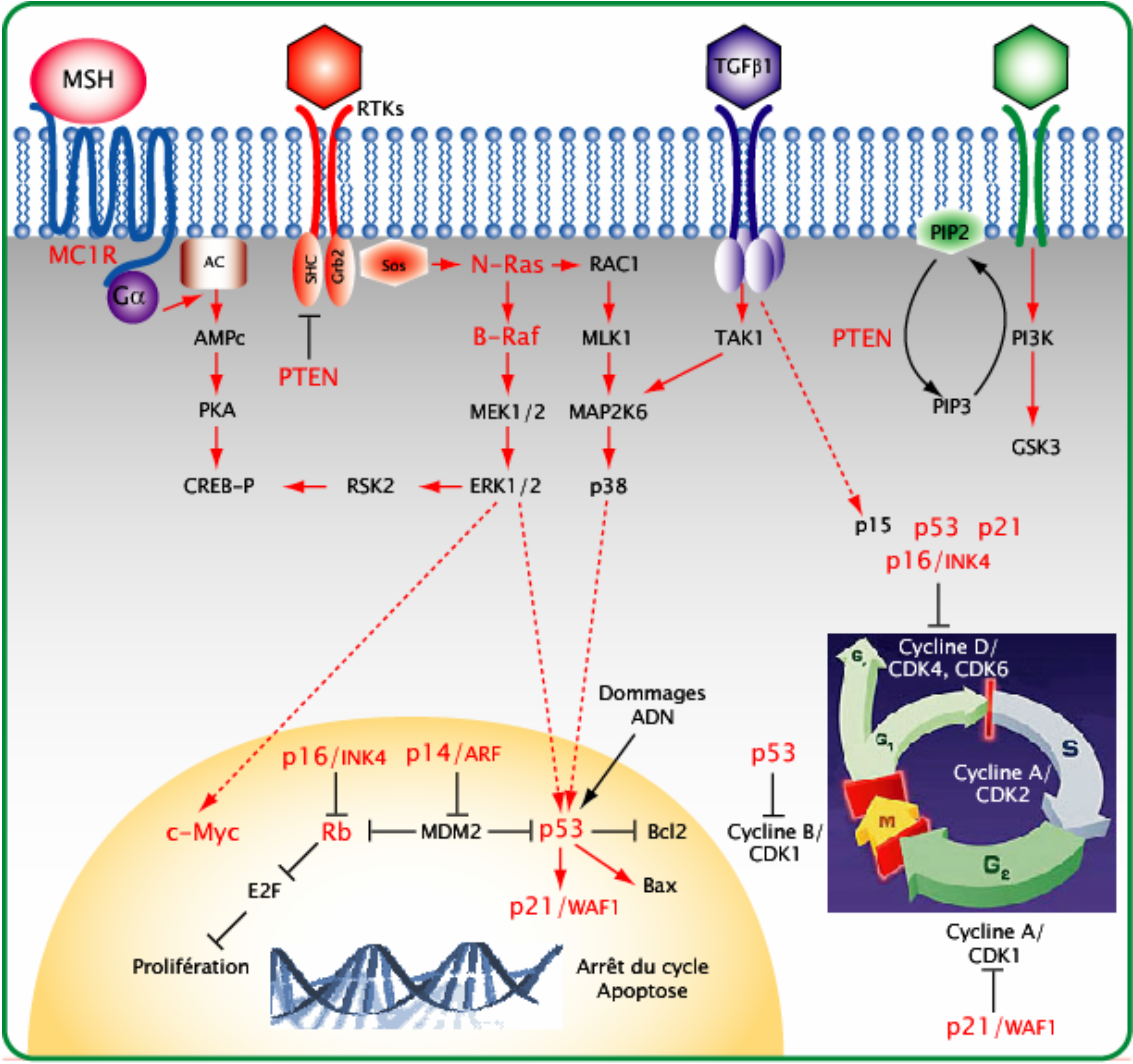


Figure 21: Gènes de susceptibilité au mélanome

2.3.3> Les facteurs génétiques

La progression du mélanome est cliniquement bien définie à l'aide des différents critères histopathologiques et biologiques. En revanche, les avancées en biologie moléculaire sont récentes. Les recherches génétiques ont permis de mettre en évidence un nombre important de gènes associés à des susceptibilités variables de développer des cancers cutanés (Rodolfo, Daniotti et al. 2004). Les mélanomes malins, définis par différentes catégories clinico-pathologiques, n'ont pas de relation avec les critères pronostiques ou thérapeutiques. Il est donc important d'identifier des marqueurs génétiques associés à la progression tumorale. La majorité de ces gènes code des suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes, constituant ainsi le point de départ pour l'identification des profils génétiques des différents mélanomes.

L'analyse génétique globale par hybridation comparative des génomes (CGH) pour l'analyse de la progression des mélanomes, a permis l'identification de différentes anomalies chromosomiques récurrentes : avec des pertes dans les chromosomes 1, 6, 9 et 10 et des gains dans les chromosomes 6, 7 et 8 qui apparaissent dans 95% des cas (Rodolfo, Daniotti et al. 2004). Cependant, ces anomalies chromosomiques diffèrent selon le type de mélanomes. Les régions amplifiées correspondent généralement à des oncogènes connus tels que *Braf*, *Ras*, *Cdk4*, cycline D1, et *hTert* mais aussi à des gènes de fonctions inconnues.

Des études génétiques ont permis l'identification de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs : *TP53*, *pRB*, *CDKN2A*, *CDK4*, *CDKN1A*, et les oncogènes *BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *CMYC* associées au mélanome (*Figure 21*) (Rodolfo, Daniotti et al. 2004). Les mutations de ces gènes peuvent être présentes dans les naevi dysplasiques et peuvent donc constituer des facteurs de risque de mélanome (Papp, Pemsel et al. 2003).

Le locus 7q33 Braf et le locus 1p13 NRAS

En 2002, les efforts du projet du génome humain sur la recherche des gènes associés au cancer, ont conduit à l'identification d'une mutation dans l'oncogène *BRAF* retrouvée très fréquemment dans les mélanomes (Davies, Bignell et al. 2002). Cette découverte conduit à l'identification de la mutation V600E, comme la plus souvent retrouvée dans les tumeurs solides (Gorden, Osman et al. 2003) et dans les mélanomes avec une fréquence d'environ 50% (Kumar, Angelini et al. 2003). Les mutations *BRAF* sont des événements précoces détectables dans les naevi dysplasiques (Kumar, Angelini et al. 2004), qui sont de plus en plus fréquentes selon le stade du mélanome des lésions précoces à la métastase (Rodolfo, Daniotti et al. 2004). Elle est également plus fréquente chez les patients jeunes (Shinozaki, Fujimoto et al. 2004) et dans les mélanomes apparaissant sur les parties du corps exposées au soleil

(Maldonado, Fridlyand et al. 2003). L'association des mutations du gène *BRAF* avec des mutations d'autres gènes tel que *MC1R* est également important dans le risque de développement d'un mélanome (Rivers 2004).

Le gène *BRAF* code une sérine thréonine kinase activatrice de la voie des MAPK, régulée par la liaison avec la protéine Ras (Mercer and Pritchard 2003). La substitution V600E dans le domaine d'activité kinase, mime la phosphorylation activatrice de Braf conduisant à l'activation constitutive de la voie Ras-ERK. Le transfert *in vitro* de mutants du gène *BRAF* dans les mélanocytes entraîne l'acquisition d'un phénotype transformé du fait d'une prolifération augmentée et de la capacité à former des tumeurs après transplantation chez les souris nudes (Wellbrock, Ogilvie et al. 2004). De plus, l'inhibition spécifique de l'expression de *BRAF* par utilisation d'ARN antisens, ou encore l'inhibition de la voie des MAPK, entraîne un arrêt de la croissance de lignées cellulaires de mélanomes, et s'oppose à la croissance induite lors de la surexpression de *BRAF* liée à l'amplification de la région 7q33 dans les mélanomes (Tanami, Imoto et al. 2004). Ces résultats impliquent fortement le gène *BRAF* dans la transformation maligne des mélanocytes ainsi que la progression des mélanomes, cependant les mutations de ce gène ne constituent pas une signature d'apparition de mélanome induite par les rayonnements UV. D'autres facteurs doivent donc intervenir suite aux UV dans la transformation maligne.

Les mutations activatrices de l'oncogène *NRAS* ont dans un premier temps été identifiées dans les lignées cellulaires de mélanomes (Padua, Barrass et al. 1985), et par la suite différentes mutations de *NRAS* ont été décrites dans les tumeurs (van 't Veer, Burgering et al. 1989). La mutation Q61R de *NRAS* est retrouvée dans 20% des mélanomes. De la même manière que pour *BRAF*, elle conduit à la même activation constitutive de la voie des MAPK, et est retrouvée de manière exclusive dans les mélanomes. Des mutations des gènes *HRAF* ou *KRAF* peuvent également être retrouvées plus rarement dans les mélanomes. Les mutations de *RAS* sont par ailleurs plus fréquentes dans les tumeurs primitives localisées aux niveau des zones exposées continuellement aux UV que les mélanomes non exposées (Ball, Yohn et al. 1994).

L'activation constitutive de la voie des MAPK constitue un évènement précoce et fréquent dans l'apparition du mélanome (70%). L'hypothèse est que l'activation de ERK est nécessaire pour la progression du mélanome et la formation des métastases. La voie des MAPK doit intervenir dans le contrôle du niveau des protéines matricielles et donc dans l'adhésion cellulaire. La régulation du facteur de transcription Mitf par la voie des MAPK semble également être essentielle à la progression du mélanome et à la survie cellulaire.

Les mutations de *BRAF* et de *NRAS* sont également associées avec des pertes d'hétérozygotie du chromosome 9 correspondant au locus *CDKN2A*, évènement qui peut être associé à l'initiation de la prolifération du mélanome (Kumar, Angelini et al. 2004). Ces mutations sont également souvent associées à des mutations des gènes *PTEN*, *TP53*, ou *CDK4*.

Le locus 9p21 CDKN2A : p16/INK4a + CDK4 : p14/ARF

Dans de nombreux mélanomes, on observe une perte d'hétérozygotie du locus 9p21, qui a permis de mettre en évidence un gène de susceptibilité, délété dans les mélanomes survenant dans un contexte familial (8 à 12% des mélanomes) : *CDKN2A* (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2) (Ruiz, Puig et al. 1998; Puig, Malvey et al. 2005). Ce gène, particulier, code deux protéines distinctes : p16/INK4a (INhibitor of Kinase a) et p14/ARF (Alternative Reading Frame). La protéine p16/INK4a comprenant les exons 1 α , 2 et 3 est une protéine régulatrice du cycle cellulaire qui inhibe l'activité des complexes cycline D1/CDK4 (Cyclin Dependant Kinase 4) et cycline D1/CDK6. De ce fait p16/INK4a régule négativement la croissance cellulaire en arrêtant les cellules en phase G1 du cycle cellulaire (*Figure 21*) (Sharpless and Chin 2003). La protéine p14/ARF est produite par un décalage du cadre de lecture (Alternative Reading Frame) et comprend les exons 1 β , 2 et 3. Elle agit sur la régulation de la protéine p53 pour induire un arrêt du cycle cellulaire puisqu'elle stabilise le taux protéique de p53 en inhibant sa dégradation par la protéine Mdm2 (Mouse double minute) (*Figure 21*). Les pertes simultanées de p16/INK4a et p14/ARF participent ainsi à la progression du cycle.

Alors que l'incidence des mutations du gène *CDKN2A* dans les mélanomes familiaux est évidente avec une fréquence de 25 à 40%, le rôle de ce gène dans les mélanomes sporadiques est moins évident, du fait que l'inactivation de p16/INK4a et p14/ARF se fait par délétion du gène (Hayward 2003; Sharpless and Chin 2003), par méthylation du promoteur ou par la présence de modifications post-traductionnelles (Merlo, Herman et al. 1995; Cody, Huang et al. 1999; Honoki, Tsujiuchi et al. 2004). L'inactivation par délétion ou par mutation du gène *CDKN2A*, qui est plus importante dans les métastases que dans les mélanomes primaires favorisant une prolifération anormale (Rizos, Darmanian et al. 2001; Rizos, Puig et al. 2001).

Enfin, l'association de mutants de *CDKN2A* à des variants du gène *MC1R* augmente de manière significative le risque de mélanome avec une pénétrance qui passe de 50% à 84% (Box, Duffy et al. 2001; Peris, Fagnoli et al. 2004).

Le locus 6p21.2 CDKN1A : p21/WAF1

Le gène *CDKN1A*, localisé en position 6p21, code une protéine de 21 kDa de la famille des CDKI qui intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S en s'associant et inhibant les kinases dépendantes du cycle (*Figure 21*). L'activation transcriptionnelle de *CDKN1A* est régulée par p53 suite à différents stress cellulaires, dont les dommages de l'ADN. Dans les mélanomes métastatiques, *TP53* est surexprimé sans pour autant avoir une inhibition du cycle associée à p21. L'absence d'inhibition du cycle dans les mélanomes semble être liée à la présence de mutations de la région promotrice du gène *CDKN1A* à l'origine de différences de niveau de protéine p21 (Vidal, Loganzo et al. 1995). Cette variation du niveau d'expression de *CDKN1A* dans les mélanomes peut être due à la dérégulation de la voie des MAPK et du facteur de transcription Mitf (cf. § Le rôle du facteur de transcription Mitf, page 52).

Le locus 10q23 : PTEN

Dans 30% des mélanomes, une perte d'hétérozygotie de la région 10q23, comprenant le gène suppresseur de tumeur *PTEN* est observée (Rodolfo, Daniotti et al. 2004). *PTEN* code une phosphatase au double rôle. Par son activité lipide phosphatase, *PTEN* inhibe la voie PI3K/AKT, impliquée dans la régulation de la phase G1 du cycle cellulaire et dans l'apoptose. Par son activité protéine phosphatase, *PTEN* inhibe la voie des MAPK (*Figure 21*) (Wu, Goel et al. 2003). Les analyses fonctionnelles mettent en évidence le rôle primordial de *PTEN* dans le développement de mélanomes : ainsi l'expression ectopique de *PTEN* dans les cellules de mélanome déficientes pour le gène *PTEN*, diminue le caractère tumoral et le pouvoir métastatique des cellules (Hwang, Yi et al. 2001). Bien que les informations soient limitées, la fréquence des pertes d'hétérozygotie semble être identique entre les mélanomes primaires et métastatiques, suggérant que *PTEN* interviendrait plutôt dans l'initiation du mélanome. *PTEN* est toujours présent dans le naevus commun mais disparaît dans le naevus dysplasique (Parmiter, Balaban et al. 1988).

Les mutations germinales et somatiques de *PTEN* ont été caractérisées. La majorité de ces mutations impliquent l'exon 5 (30%) ; elles incluent des mutations non sens, des délétions, des insertions, et des mutations de sites d'épissage, entraînant généralement un arrêt prématuré de la transcription ou à l'inactivation de la protéine (Wu, Goel et al. 2003). Les mutations somatiques du gène *PTEN* sont plus fréquentes dans les lignées cellulaires (environ 30 à 40%), que dans les cellules primaires (environ 10%) (Guldberg, thor Straten et al. 1997; Tsao, Zhang et al. 1998).

L'inter-relation des mutations de *PTEN*, avec les altérations des autres gènes, est importante pour le mélanome. L'inactivation de PTEN conduit à l'inhibition de la voie des MAPK en permettant la déphosphorylation de Braf. Il semblerait donc que l'inactivation de PTEN et l'activation de Ras auraient des fonctions similaires activatrices de la voie des MAPK. De plus, PTEN et N-Ras ont des fonctions inverses sur l'activation de la voie PI3K/AKT. Dans les mélanomes, les mutations de *PTEN* et de *NRAS* seront généralement retrouvées de manière indépendante. Les échantillons présentant des mutations de *PTEN*, mais pas de perte de la protéine, portent également des mutations de *TP53* (Daniotti, Oggionni et al. 2004).

Le locus 17p13 : p53

La protéine p53 "gardien du génome" intervient dans le contrôle de la prolifération en réponse aux dommages de l'ADN. Le blocage du cycle cellulaire permet l'activation des systèmes de réparation et le déclenchement éventuel de l'apoptose (*Figure 21*). La protéine p53 a une durée de vie courte et n'est pas détectable dans les naevi, alors qu'elle est surexprimée dans les mélanomes, de manière d'autant plus importante que l'épaisseur de la tumeur est grande ou qu'il s'agit d'un stade métastatique (Radhi 1999). Les mécanismes de stabilisation de la protéine p53 dans les mélanomes ne sont pas très clairs, ils sont peut être simplement associés à la présence de mutations du gène suppresseur de tumeurs *TP53* (Ragnarsson-Olding, Karsberg et al. 2002; Shen, Liu et al. 2003; Ragnarsson-Olding, Platz et al. 2004). La fréquence des mutations de *TP53* dans les mélanomes est proche de 25% alors que la fréquence générale est de 10% (Zerp, van Elsas et al. 1999). Il s'agit principalement de transitions C→T ou de changements en tandem CC→TT, impliquant de manière forte les UV comme agent mutagène, et conduisant à l'inactivation de la protéine (Ragnarsson-Olding, Karsberg et al. 2002).

La protéine p53 joue un rôle clé dans la protection de la peau en permettant la protection vis-à-vis des UV. En effet, les souris homozygotes pour *TP53* ont moins de risque de développer un cancer de la peau que les souris hétérozygotes (Jiang, Ananthaswamy et al. 1999). La protéine intervient dans la stimulation de la mélanogénèse en induisant à la fois l'expression des gènes *TYR* (Khlgtian, Hadshiew et al. 2002) et *TRP1* (Nylander, Bourdon et al. 2000). Par contre, lorsque le gène *TP53* est muté, la protéine p53 devient inactive et intervient alors dans le développement du mélanome. Elle ne joue alors plus son rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire et favorise la progression du mélanome. Les mutations

de *TP53*, sont également souvent associées avec les mutations des autres gènes *CDKN2A*, ou *BRAF* (Patton, Widlund et al. 2005) et vont intervenir de manière synergique dans l'initiation et la prolifération du mélanome.

Le locus 13q14 : pRB

La protéine pRb intervient également dans le contrôle de la prolifération en inhibant le facteur de transcription E2F (*Figure 21*). La régulation de la protéine pRB est liée à la protéine p53. Des études ont montré que l'expression de *pRB* était diminuée de 55 à 70% 12h après stimulation par les UVB dans les lignées de mélanocytes et de mélanomes (Pedley, Ablett et al. 1996). L'inhibition du niveau de pRB peut alors intervenir dans les mécanismes de transformation maligne du mélanome, dans la mesure où elle ne va plus jouer son rôle inhibiteur de la prolifération.

Le locus 8q24 : c-Myc

L'oncogène c-Myc est un facteur de transcription, dont les gènes cibles interviennent dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose, avec des liens avec la machinerie de régulation transcriptionnelle, le remodelage de la chromatine, et la réparation de l'ADN. Le gène *c-MYC* est fréquemment surexprimé dans les mélanomes avec un gain de copies de la région 8q24 dans les mélanomes nodulaires (Greulich, Utikal et al. 2000) et les métastases (Kraehn, Utikal et al. 2001) alors que ce gain n'est pas présent dans les naevi. Il a été montré récemment que l'activation de c-Myc pouvait être associé à des dommages de l'ADN et ainsi accélérer la progression tumorale du fait cette instabilité génétique (Vafa, Wade et al. 2002). Les mécanismes d'implication de c-Myc dans les mélanomes restent encore à élucider.

Le locus 6q21 : AIM1

Des pertes d'hétérozygotie de la région 6q21 ont été observées dans les mélanomes (28%) (Bastian, LeBoit et al. 1998). Le gène *AIM1* (Absent In Melanoma), localisé en 6q21, code une protéine de la superfamille des cristallines $\beta\gamma$ et présente des similarités avec les protéines se liant à l'actine (Ray, Wistow et al. 1997). AIM1 intervient dans l'inhibition de contact cellulaire et pourrait exercer ses effets par ses interactions avec le cytosquelette. La délétion ou mutation du gène favoriseraient le développement de la phase verticale de croissance (VGP) et la formation de métastases.

Le locus 15q11 : OCA2

Le gène P, localisé sur le chromosome 15q11, est associé à l'albinisme oculaire cutané de type 2 (OCA2) caractérisé par une peau claire et une susceptibilité accrue aux cancers de la peau (Gardner, Nakatsu et al. 1992; Ramsay, Colman et al. 1992). Le gène P code une protéine de 12 domaines transmembranaires de 110 kDa, qui est présente dans les kératinocytes et les mélanocytes (Rosemblat, Durham-Pierre et al. 1994). Cette protéine intervient dans la biodisponibilité en Tyrosine en favorisant le transport à l'intérieur des kératinocytes en régulant le pH intramélanosomal (cf. § Les facteurs influençant la mélanogénèse, page 63). A l'heure actuelle ; plus de 60 mutants différents ont été associés à l'albinisme oculaire de type 2 (Oetting, Garrett et al. 2005). Par ailleurs, le gène *OCA2* (pink eye diluted locus), en association avec les variants du gène *MC1R*, est un gène de susceptibilité au mélanome. La présence des variants R305W, et R419N, préalablement associés avec la couleur des yeux, avec les variants de *MC1R*, augmente de manière significative le risque de mélanome (Duffy, Box et al. 2004; Jannot, Meziani et al. 2005).

2.3.4> Les anomalies génétiques associées au mélanome

Les facteurs qui interviennent dans le développement du mélanome et qui constituent des éléments de susceptibilité, peuvent être classés en différentes catégories ([Tableau 3](#)). L'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *pRB*, *CDKN1A*, *CDKN2A*) par perte d'hétérozygotie ou par mutation constitue le premier niveau précoce de régulation. Dès lors, il y a levée du contrôle de la prolifération cellulaire, favorable à la progression du mélanome. L'activation constitutive des oncogènes (*BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *c-MYC*) successive à une mutation, va conduire à l'activation de voies et facteurs cellulaires favorisant la progression du cycle.

Le risque de mélanome est également augmenté lors de mutations de gènes de la pigmentation. Le gène codant le récepteur membranaire *MC1R* constitue l'un des facteurs clé dans l'apparition du mélanome. Dans une moindre mesure, les gènes *AIM1* ou *OCA2* peuvent également influencer la progression des mélanomes.

L'implication respective des différents gènes dans l'apparition du mélanome ne souffre d'aucune discussion, même si les mécanismes aboutissant à la cancérisation cutanée ne sont pas encore clairement définis. L'association de mutations ou délétions des ces différents gènes de susceptibilité constitue en général un facteur aggravant du mélanome. Le rétablissement du contrôle de ces différentes voies cellulaires devrait constituer des pistes intéressantes pour le traitement du mélanome, malgré la complexité des mécanismes à prendre en compte.

protéine	chromosome humain	locus humain	variants associés au mélanome	OMIM#
protéines signal				
MC1R	MC1R	16q24.3	V60L, D84E, R151V, R160W, D294H	155555
protéines mélanosomales				
protéine P	P gene/OCA2	15q11.2-q12	R305W, V443I, 25bp ins nt39, 112bp ins 39	203200
protéines structure				
AIM1	AIM1	6q21	perte d'hétérozygotie de la région 6q	601697
oncogènes				
N-Ras	NRAS	1p13.2	Q61R, Q61K	164790
Braf	BRAF	7q33-q34	V600E, V600D, G466R, L597S	164757
PTEN	PTEN	10q23.31	D25N, P38F, Y76X, T167A, 179X, 189X, C211X, V217I, P244S, 297X, R335X, P339L, ex6 del	601728
c-Myc	c-MYC	8q24.12-q24.13	amplification de la région 8q24	190080
gènes suppresseurs de tumeur				
p16/INK4	CDKN2A	9p21	R24P, M53I, V59G, A94E, G101W, R105ins, V126D	600160
p14/ARF	CDKN2A	9p21	G122R, V126D, R232X, G259S, 6bp del nt363	600160
p21/WAF1	CDKN1A	6p21.2	S31R, amplification de la région 6p	116899
p53	TP53	17p13.1	R72P	191170
pRB	RB	13q14.1-q14.2	perte d'hétérozygotie de la région 13q	180200

Tableau 3: Les gènes de susceptibilité au mélanome

2.5> Les thérapies du mélanome

A ce jour, il n'existe pas de thérapie réellement efficace des mélanomes métastatiques. C'est pourquoi, il est important de détecter précocement grâce à l'ensemble des critères histopronostiques (cf. § Les critères histopronostiques, page 83) les naevi à risque. L'excérèse chirurgicale du naevus dysplasique permettra dans la majeure partie des cas d'éliminer définitivement la tumeur et d'éviter les récurrences.

En fonction des résultats de l'analyse histo-anatomopathologique, une marge de sécurité sera réalisée. La largeur de cette marge constitue un élément déterminant et significatif pour la récurrence. L'ensemble des études réalisées a abouti aux consignes suivantes. Pour les mélanomes invasifs de 1 mm ou moins, la marge de sécurité adéquate doit être de 1 cm. Les mélanomes compris entre 1 et 2 mm nécessitent une excérèse minimale de 2 cm (Thompson, Scolyer et al. 2005). En fonction, de la zone touchée (tête, cuir chevelu, muqueuses...), des règles précises doivent être appliquées.

A l'heure actuelle, la plupart des traitements du mélanome métastatique est en phase de validation. Plusieurs stratégies sont actuellement envisagées, telles que l'immunothérapie basée sur la reconnaissance spécifique par les lymphocytes T de type CD8 et CD4 d'antigènes spécifiques du mélanome (MART, MelanA...) (Jotereau, Labarriere et al. 2003) ou sur le ciblage des cellules dendritiques de l'épiderme (Yannelli and Wroblewski 2004); la chimiothérapie utilisant des agents classiques (la dacarbazine, cis-platine, vinblastine...) ou inhibant spécifiquement Braf par le BAY-43-9006 (Chudnovsky, Khavari et al. 2005).

Les différentes thérapies en cours s'avèrent malheureusement pour le moment peu efficaces, la prévention et le dépistage du mélanome reste donc la meilleure stratégie thérapeutique avec un suivi régulier par le dermatologue en fonction du risque relatif de chaque patient. De plus, il est donc important de bien respecter des habitudes simples de protections vis-à-vis du soleil (savoir éviter les expositions solaires aux heures les plus chaudes de la journée, se protéger la peau par des vêtements et/ou des crèmes solaires écran total, protéger les enfants...).

Soleil : vous serez prévenus...

Les cancers de la peau sont de plus en plus fréquents et le mélanome est celui qui augmente le plus rapidement en France. Alors un seul mot d'ordre : protégez-vous et protégez vos enfants !

1> Introduction

La pigmentation constitutive fait intervenir un nombre important de facteurs et de mécanismes de régulations caractérisant ainsi la couleur de la peau de chaque individu (cf. Etude Bibliographique). Tandis que la réponse pigmentaire induite par les UV, bien que dépendante de la pigmentation constitutive, définit la capacité de protection contre les rayonnements ultraviolets. L'organisme est ainsi capable d'activer des mécanismes moléculaires supplémentaires permettant une induction rapide et efficace de la synthèse de la mélanine et son transfert vers les mélanosomes dans les couches supérieures de l'épiderme. Les cellules de l'épiderme font appel à un ensemble de stratégies pour contrôler la synthèse de l'eumélanine, en jouant par exemple sur la biodisponibilité des différents substrats de synthèse et l'utilisation des stocks cellulaires en tyrosine. Cette voie n'est généralement pas le facteur limitant et la synthèse de l'eumélanine est vraisemblablement plutôt dépendante de la quantité et de l'activité des facteurs de la pigmentation. Ainsi, la principale régulation induite par les UV est obtenue par le contrôle de l'expression des gènes de la pigmentation (*TYR*, *TRP1*, *DCT*...) permettant une augmentation globale et rapide des niveaux protéiques. Ce contrôle peut se faire de manière directe par le facteur de transcription ubiquitaire USF-1, qui appartient à la famille des "Upstream Stimulating Factor" de type bHLH-LZ. Après activation par phosphorylation par la MAP kinase p38 au niveau de la thréonine 153, suite à une irradiation par les UV, USF-1 va réguler l'expression du gène *TYR* pour induire la pigmentation (Galibert, Carreira et al. 2001).

Mes travaux de thèse, centrés sur la réponse UV ont permis dans un premier temps de caractériser et de compléter les mécanismes moléculaires de la réponse pigmentaire UV-induite, par utilisation de modèles d'étude *in vitro* (Corre, Primot et al. 2004), *in vivo* et *ex vivo* (Corre, et al. 2005, JID soumis) ; et de nous intéresser au facteur de transcription USF-1. Ce facteur a préalablement été impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes intervenant dans des processus cellulaires variés. Les mécanismes d'action d'USF-1 ainsi que ses différents rôles ont par ailleurs été largement décrits dans la revue suivante (Corre and Galibert 2005).

La spécificité d'action, ainsi que la multitude de cibles potentielles font qu'il constitue un élément clé pour la compréhension des mécanismes de protection contre les rayonnements ultraviolets, permettant de distinguer les bases moléculaires de la pigmentation UV-induite de

la pigmentation constitutive, qui repose majoritairement sur le rôle du facteur de transcription Mitf. En effet, les facteurs de transcription Mitf et USF-1 présentent de grandes similitudes d'action, qui expliquent en partie le rôle complémentaire de ces deux facteurs. Nous avons pu montrer que USF-1 est impliqué dans la régulation des gènes la pigmentation (*POMC* et *MC1R*) en réponse aux UV (Corre, Primot et al. 2004).

La pigmentation UV-induite ne se résume cependant pas à ces mécanismes de régulation et implique un nombre important de composants, comme la coopération cellulaire entre les kératinocytes et les mélanocytes ou le rôle des facteurs paracrines sur les différentes voies cellulaires. La mise en place d'une étude de la réponse pigmentaire dépendante des UV dans un modèle intégratif de peau, nous a également permis de mieux comprendre quels sont les mécanismes qui sont impliqués dans la régulation de la pigmentation UV dépendante (Corre, et al. 2005, JID soumis).

Enfin, la dernière partie de la thèse présente pour la première fois l'identification d'une nouvelle forme post-traductionnelle du facteur de transcription USF-1 qui apparaît en réponse à différents stress cellulaires. La présence de cette nouvelle forme majeure (M-USF-1) semble être associée à une diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription ; et ouvre de nouvelles perspectives de fonctions pour USF-1 (Corre, et al. 2005, en préparation). M-USF-1 pourrait, en effet, intervenir dans la régulation du cycle cellulaire ; et pourrait jouer un rôle potentiel dans l'acquisition du phénotype cancéreux en réponse aux rayonnements UV, pour lequel il n'a pour le moment jamais été impliqué.

2> Rôle du facteur de transcription USF-1 dans la régulation de l'expression génétique

2.1> Généralités

Le nombre limité de gènes chez l'homme (27000) ne permet pas d'expliquer la très grande diversité des mécanismes cellulaires. C'est par contre la combinaison d'un grand nombre de composants à un instant précis qui va permettre d'expliquer cette complexité. La régulation des nombreux processus cellulaires (division, apoptose...) est dépendante de l'expression des gènes qui est contrôlée de manière précise par le complexe transcriptionnel et les facteurs associés. Le rôle des facteurs de transcription est alors essentiel pour plusieurs raisons. Ils sont d'abord capables de se fixer sur des motifs consensus des promoteurs, pour réguler de manière spécifique l'expression de gènes. La spécificité peut être augmentée par le recrutement de cofacteurs et/ou éléments de la machinerie de transcription. Enfin, les facteurs de transcription sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles, permettant de moduler leur capacité de liaison aux motifs consensus, leur activité transcriptionnelle intrinsèque, et leur capacité d'interaction avec la machinerie de transcription.

Nous nous intéressons ici aux facteurs de transcription ubiquitaires de la famille des "Upstream Stimulating Factor" (USF) de type bHLH-LZ (*Figure 22*). Ces facteurs jouent un rôle majeur au niveau de la cellule. Ils sont particulièrement intéressants car ils interviennent de manière spécifique et très contrôlée dans la régulation de l'expression d'un nombre important de gènes, impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Les deux revues présentées ont pour objectifs de synthétiser les données publiées sur les deux facteurs de transcription USF (Corre and Galibert 2005). Il s'agit de regrouper les informations concernant la structure de leur gène et de leur protéine, les modes de régulation de l'activité transcriptionnelle, dépendante de la liaison spécifique aux motifs consensus (CANNTG) appelés boîtes E, et du recrutement des nombreux facteurs de remodelage de la chromatine et cofacteurs de la machinerie de transcription. Enfin, ces revues ont pour objectif de montrer de manière non exhaustive le rôle respectif des facteurs de transcription USF dans la régulation des gènes du métabolisme des lipides et des glucides, du contrôle de la prolifération cellulaire, de la réponse immunitaire et de la pigmentation UV-induite.

2.2> Copie du 1^{ère} et 2^{ème} articles

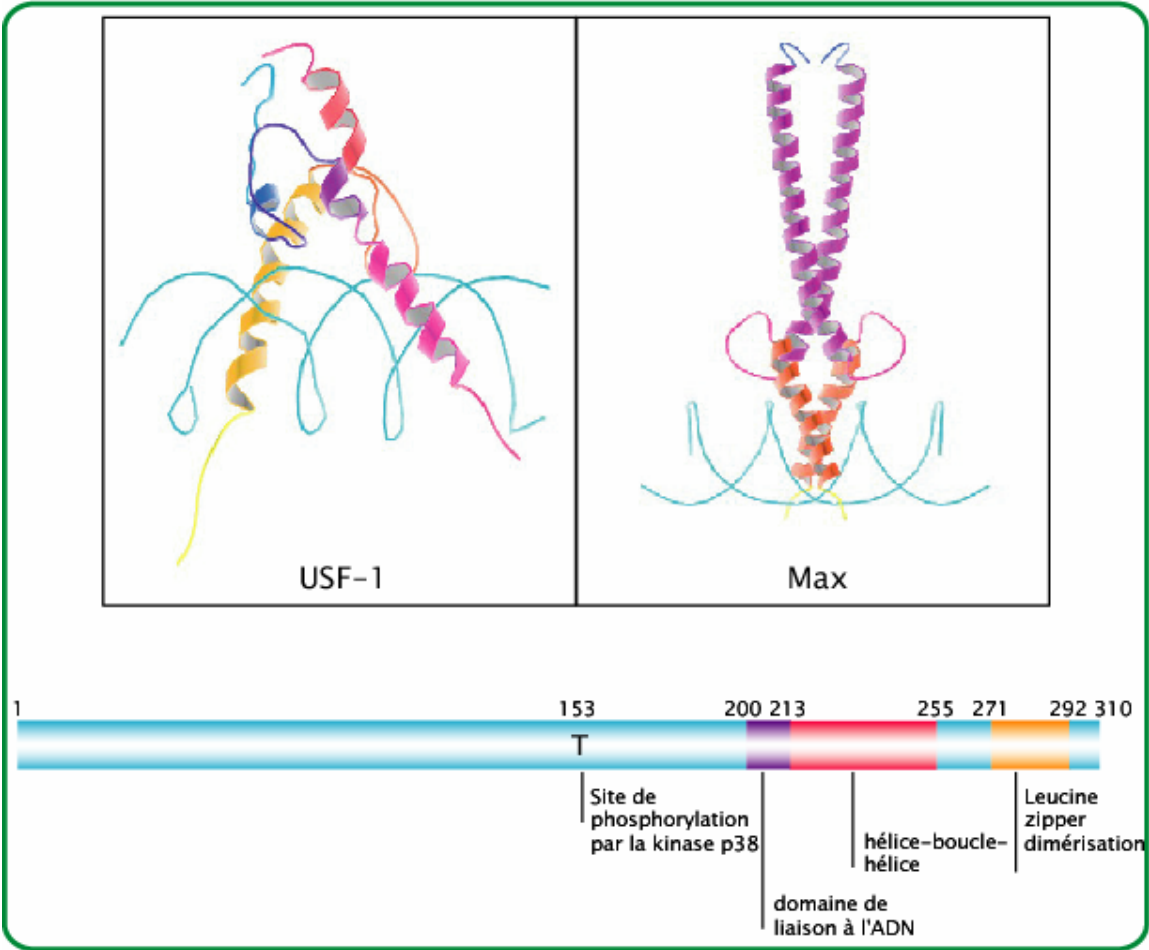


Figure 22: Structure de la protéine USF-1

Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors

Sébastien Corre and Marie-Dominique Galibert*

CNRS UMR 6061 Laboratoire de Génétique et Développement, Faculté de Médecine, Université de Rennes-1, Rennes Cedex, France

*Address correspondence to Marie-Dominique Galibert, e-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr

Summary

Upstream stimulating factors (USF), USF-1 and USF-2, are members of the eucaryotic evolutionary conserved basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper transcription factor family. They interact with high affinity to cognate E-box regulatory elements (CAN-NTG), which are largely represented across the whole genome in eucaryotes. The ubiquitously expressed USF-transcription factors participate in distinct transcriptional processes, mediating recruitment of chromatin remodelling enzymes and interacting with co-activators and members of the transcription pre-initiation complex. Results obtained from both cell lines and knock-out mice indicates that USF factors are key regulators of a wide number of gene regulation networks, including the stress and immune responses, cell cycle and proliferation, lipid and glucid metabolism, and in melanocytes USF-1 has been implicated as a key UV-activated regulator of genes associated with pigmentation. This review will focus on general characteristics of the USF-transcription factors and their place in some regulatory networks.

Key words: USF-1/transcription factor/E-box/UV-induced pigmentation/immune response/cell proliferation/glucid-lipid metabolism

Received 5 June 2005; revised and accepted for publication 11 July 2005

USF genes

The upstream stimulatory transcription factor (USF) family was first identified in human cells because of their involvement in the transcription regulation of the adenovirus major late promoter (Carthew et al., 1985;

Moncollin et al., 1986; Sawadogo and Roeder, 1985). The complete purification of USF, from HeLa cell nuclei gave two related polypeptides of 43 and 44 kDa (Sawadogo, 1988; Sawadogo et al., 1988). Microsequencing analysis of the 43 and 44 kDa proteins resulted in the identification of human *USF-1* and *USF-2* genes respectively (Gregor et al., 1990; Sirito et al., 1992, 1994). *USF-1* orthologues have been identified in several species, including yeast (Atchley and Fitch, 1997; Ferreiro et al., 2004), *Xenopus* (Kaulen et al., 1991), sea urchin (Kozlowski et al., 1991), mice (Henrion et al., 1996) and rat (Galibert et al., 1997). Sequence analysis has revealed that *USF-1* is evolutionarily well conserved with *Xenopus* and sea urchin *USF-1* cDNA showing 88% identity while the human *USF-1* cDNA, and mice, rat and human *USF-1* cDNA show up to 90% identity. The similarity is even higher in the proteins, with about 99% identity between rat, mice and human USF-1 proteins (Galibert et al., 1997). Comparable results were observed for orthologous *USF-2* genes (Henrion et al., 1995; Lin et al., 1994), with murine *USF-1* and *USF-2* cDNA having 59% identity (Figure 1A) (Lin et al., 1994; Sirito et al., 1994).

In mammals, *USF-1* and *USF-2* have a similar genomic organization, each comprising 10 exons (Figure 1A) spanning 4 kb for *USF-1* and 10 kb for *USF-2* (Henrion et al., 1995, 1996; Lin et al., 1994) with S1 nuclease mapping determining the transcription start sites. Both promoters lack an obvious TATA box motif, but an initiator element (Inr) consistent with the Inr pyrimidine consensus sequence (YYAYTCYYY) (Breathnach and Chambon, 1981; Smale and Baltimore, 1989) could be found. In addition, the *USF-2* gene promoter, but not the *USF-1* promoter, is characterized by two E-box motifs located at -332 and -186 from the transcription start site, potentially allowing regulation of the *USF-2* gene by USF factors (Lin et al., 1994; Sirito et al., 1998).

Shieh et al. (1993) located the human *USF-1* gene on the chromosome 1 in the q22-q23 region and in mice, *USF-1* was assigned to chromosome 1 (Henrion et al., 1995). The human and murine *USF-2* genes were assigned to chromosomes 19q13 and 7 respectively (Groenen et al., 1996).

Protein structure and protein interaction

The cloning of *USF-1* and *USF-2* revealed that both proteins are members of the highly conserved family of basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper proteins (bHLH-

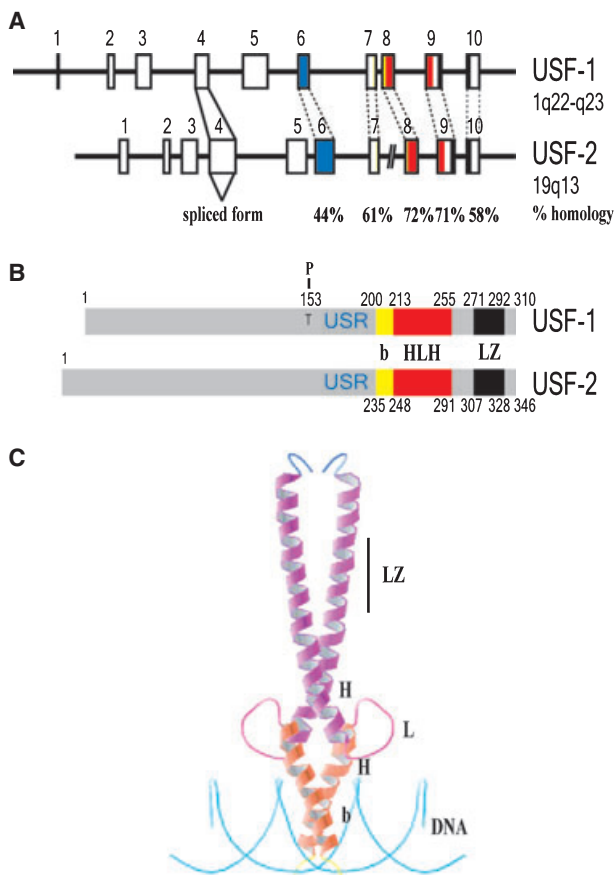


Figure 1. Gene and protein structure of the ubiquitous transcription factors, upstream stimulating factor (USF). (A) USF-1 and USF-2 genes constitute 10 exons. Sequences in colour correspond to the basic domain (yellow), the Helix-Loop-Helix (red) and Leucine-Zipper (black) (b-HLH-LZ) domains. The exon 4-excision form of USF protein members correspond to dominant negative regulators of the USF-transcription factors. (B,C) USF-1 and USF-2 belong to the b-HLH-LZ transcription factors and display similar protein structure. USR domain (USF-specific region), located upstream from the basic region is essential for transcriptional activation of promoters containing both the TATA box and the initiator element. USF-1 phosphorylation on T153 is necessary for transcription activity.

LZ) (Figure 1C) (Atchley and Fitch, 1997). These include Myc (Murre et al., 1989) and the Myc-subfamily factors Max (Blackwood and Eisenman, 1991), Mad (Ayer et al., 1993) and Mxi1 (Zervos et al., 1993) as well as the microphthalmia-associated transcription factor, Mitf (Tassabehji et al., 1994), and the highly-related factors TFEB (Carr and Sharp, 1990), TFEC (Yasumoto and Shibahara, 1997), TFE3 (Beckmann et al., 1990).

The bHLH-LZ proteins have a highly conserved DNA-binding domain, composed of a basic (b) region, followed by a helix-loop-helix (HLH) and a leucine zipper (LZ) motif (Figure 1B). Thus, the USF-1 and USF-2, b-HLH-LZ regions have 70% identity while the full length proteins present only 44% identity (Sirito et al., 1994).

Only limited regions of sequence homology could be found in the USF-1 and USF-2 N-terminal regions, one of which is highly conserved and located upstream from the basic region. This USF-specific region named USR and encoded by the exon 6, has been shown to be essential for transcription activation (Groenen et al., 1996; Luo and Sawadogo, 1996; Qyang et al., 1999) although how it operates is unknown. The presence of the contiguous HLH and LZ domains distinguishes these proteins from bHLH proteins (e.g. MyoD family, E2A) (Blackwell and Weintraub, 1990; Kophengnavong et al., 2000), bZip transcription factors (e.g. c-jun and c-fos) (Busch and Sassone-Corsi, 1990) and from other related-transcription factors lacking a basic region that act as negative regulators and does not bind DNA (e.g. Id) (Benezra et al., 1990; Ellis et al., 1990).

The basic region is involved in DNA interaction with the E-Box consensus sites CANNTG (Baxevanis and Vinson, 1993), whereas the HLH and LZ domains are mainly involved in dimerization, even though LZ integrity is essential for specific and high affinity binding (Sha et al., 1995). The HLH and LZ amphipathic α -helices therefore together mediate selective pairing for dimer formation. Consequently, protein interactions were thought to be limited to members of each b-HLH and b-HLH-LZ family subgroup (Baxevanis and Vinson, 1993; Ciarapica et al., 2003) because of recognition specificity. Therefore, USF-1 and USF-2, were first shown to interact only with each other, leading to homo- and heterodimer formation (Sirito et al., 1992, 1994), an observation consistent with the conserved region being limited to the C-terminal region that encompasses the dimerization and DNA-binding domains. More recently, USF-1 has been reported to associate *in vivo* with Fra1, a member of the b-Zip protein family, to promote transcription, demonstrating that cross-talk occurs between distant members of the protein family (Pognonec et al., 1997). The Cha bHLH transcription factor has also been shown to interact *in vivo* and *in vitro* with USF-1. The Cha/USF-1 dimer can bind an E-box motif, inhibiting USF-1 promoter activity and thereby negatively regulating USF-dependent transcription (Rodriguez et al., 2003). USF-dependent gene expression is also negatively regulated through interaction with the USF-2 splice variant, termed USF-2b (Figure 1A) (Howcroft et al., 1999; Viollet et al., 1996). The USF-2b variant lacks exon 4, which contains an additional positive-regulatory domain, whereas the USR and the negative-regulatory domain remain functional. The USF-2b variant forms heterodimeric complexes with the USF proteins, which can bind the E-box motif but fails to promote gene activation. The USF-2b variant is thus a dominant negative regulator of USF-dependant gene expression. Similarly, alternative splice events also affect USF-1 mRNA (Gao et al., 1997; Gregor et al., 1990; Saito et al., 2003). The excision of a part of exon 4 generates a novel USF-1 isoform, resulting in new heterodimeric complexes that

can modulate USF-dependent gene regulation (Saito et al., 2003).

DNA-binding properties

Symmetrical E-box motifs are the principle target-binding sites for members of the b-HLH and b-HLH-LZ transcription factor families. The canonical E-box sequence is only six nucleotides long, with some potential degenerate bases. Although its short sequence favours a broad distribution over the genome, only a restricted set of E-box motifs have been identified as DNA control elements. Sequential selection and amplification of binding-sites analysis (Blackwell and Weintraub, 1990; Blackwell et al., 1993) and DNA-binding assays (Aksan and Goding, 1998; Dang et al., 1992; Galibert et al., 1993; Halazonetis and Kandil, 1991) have been used to investigate the specific protein-DNA binding that discriminates one b-HLH-LZ transcription factor from another. Taken together, these results show that the CANNTG core E-box sequence is usually conserved, that the two central nucleotides (NN) are in most cases either GC or CG, and that altering the spacing between the CA and TG abrogates DNA binding. Conservation of the short palindromic sequence is therefore important, even if one nucleotide variation is tolerated. For example, USF-1 has a higher binding affinity for the CACGTG core motif than for the CATGTG motif that is also recognized *in vivo* by Mitf, the 'master regulator' of melanocyte development. Consistent with these observations, the crystal structure resolution of b-HLH-LZ proteins bound to cognate DNA reveals critical and specific contact points between nucleotides and amino acids in the basic region (Ferre-D'Amare et al., 1994). Importantly, the nucleotides flanking the CANNTG core sequence may also affect significantly the selectivity of the different E-box-binding proteins. A 5'-T residue is critical for Mitf binding to CATGTG motifs (Aksan and Goding, 1998), whereas it prevents Myc binding to CACGTG elements (Fisher et al., 1993). Similarly, the binding sites of several USF-1 regulated promoters, including adenovirus major late (AdML) (Sawadogo and Roeder, 1985), haeme oxygenase (Sato et al., 1989), metallothionein I (Andrews et al., 2001), adenomatous polyposis coli (APC) (Jaiswal and Narayan, 2001), DNA topoisomerase III α (Han et al., 2001), deoxycytidine kinase (Ge et al., 2003) among others possess AC residues 3' to the core E-box motif. These *in vivo* observations suggest that USF-1 can selectively recognize the CACGTGAC sequence. Thus requirement for particular residues flanking the core E-box may provide a mechanism *in vivo* to recruit only specific subsets of E-box-binding factors to specific subsets of E-box elements. Notwithstanding these observations on sequence specificity, in some contexts USF-transcription factors can bind and activate transcription from degenerate E-box sequences where no doubt promoter context dictates potential protein-protein interactions, which in turn might modulate binding of E-box factors.

Upstream stimulating factor-1 binding to specific E-box motifs can also be modulated depending on the cell type and context. Methylation at the CpG site located centrally within the E-box motif (CACpGTG), strongly inhibits complex formation (Prendergast and Ziff, 1991; Watt and Molloy, 1988) and regulates negatively gene expression. This has been described, among others (Griswold and Kim, 2001; Kumari and Usdin, 2001), for the metallothionein-I gene (Majumder et al., 1999), leading to gene silencing in mouse lymphosarcoma cells. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), within the E-box core motif, also modulates gene regulation. For example, a single G/C base transition within the USF E-box consensus of the thymidylate synthase gene, implicated in folate metabolism, prevents USF complexes from binding to its cognate sequence (Mandola et al., 2003). Considering the high frequency of the G/C polymorphism in all major racial and ethnic groups, the knowledge of this SNP would be extremely useful to tailor individual 5-fluorouracil-chemotherapy.

Multiple signal transduction pathways can also modulate the DNA-binding activity of the USF-1 protein. These pathways include the p38 stress activated kinase pathway (Galibert et al., 2001), the protein kinase A and C pathways (Xiao et al., 2002), the cdk1 pathway (Cheung et al., 1999) and the PI3Kinase pathway (Nowak et al., 2005). The p38, pKA, pKC, cdk1 kinases all phosphorylate USF-1, increasing the binding of this factor to its E-box-containing target genes. However, the PI3Kinase-regulated form of USF-1 does not bind to the E-box motif. Taken together, these DNA and protein modifications would allow precise modulation of USF gene-dependent regulation.

USF expression

Although the expression of the USF-1 and USF-2 proteins is ubiquitous (Gregor et al., 1990; Siritto et al., 1992, 1994), distinct cell-specific ratios of USF homodimers and heterodimers are found in different cell types (Siritto et al., 1994; Viollet et al., 1996). Even though, USF dimers have similar DNA-binding properties they may control differently target genes, by establishing specific interactions with different transcription factors through their distinct N-terminal domains (Kirschbaum et al., 1992; Luo and Sawadogo, 1996). Thus the cellular functions of the different USF-family members may not be completely redundant. Accordingly, *USF-1* and *USF-2* knock-out mice display distinct phenotypes, including an asymmetric influence of each gene on the expression of the other (Casado et al., 1999; Siritto et al., 1998).

USF factors are key components of the transcription machinery

The USF proteins participate in the transcriptional activation of many genes implicated in a variety of

functions and networks through distinct hierarchical mechanisms. USF transcriptional activity is dependent on the integrity of the bHLH-LZ domains for efficient DNA binding and dimerization and on the presence of activation domains located in the N-terminal region of the proteins (Figure 1B). First, USF proteins have been found to modulate gene transcription through their binding to cognate E-box motifs leading to transcription stimulation (Ferre-D'Amare et al., 1994). Secondly, interaction between USF-1 and general and cell-specific transcription factors SP1, Pea3 and MTF1, respectively, for example, leads to cooperative transcriptional regulation (Figure 2) (Andrews et al., 2001; Ge et al., 2003; Liu et al., 2004). The USF-1/Pea3 ternary complex is dependant on the presence of the LZ motif, with Pea3 recruitment by the LZ motif leading to cooperative transcription of the *Bax* gene (Firlej et al., 2005). Thirdly, USF-1 interacts directly with the transcriptional machinery of TATA-plus and TATA-less promoters. TFIID and TBP associated factors involved in the pre-initiation complex of TATA-directed gene transcription, do interact with USF-1 (Figure 2) (Bungert et al., 1992; Chiang and Roeder, 1995; Meisterernst et al., 1990; Sawadogo and Roeder, 1985; Sawadogo et al., 1988). USF-1 has also been shown to bind to the pyrimidine-rich initiator (Inr) element located near to the start site in TATA-less promoters (Du et al., 1993; Roy et al., 1991; Smale and Baltimore, 1989). Similarly, the TFII-I factor, a potential-binding element of the Inr sequence that stimulates transcription from TATA-less and Inr-containing promoters, is also able to bind to a distinct E-box element of the AdML promoter, previously identified as the USF recognition site (Roy et al., 1991, 1993). The interaction of USF-1 and TFII-I at E-box and Inr elements, is consistent with USF-1 protein structure data (Roy et al., 1997). Indeed, hydrodynamic measure-

ments of USF protein–DNA complex showed that USF factors can exist as a bivalent homotetramer, which is dependent on the integrity of the LZ domain (Ferre-D'Amare et al., 1994). Homotetramers could potentially interact simultaneously with two DNA recognition sites to allow DNA looping that would modulate gene transcription regulation (Sha et al., 1995). Finally, it has been shown that USF-1 mediates recruitment of enzymes, such as PCAF that acetylates histones, and SET7/92 that methylates histone H3K4 (West et al., 2004) (Figure 2). These recruitments allow chromatin remodelling and opening, promoting DNA loading of the transcription machinery and transcription activation. Accordingly, USF-1 interacts preferentially with highly acetylated histone H4 nucleosomal DNA (Vettese-Dadey et al., 1996). Furthermore, USF proteins have been found to direct topoisomerase III (*hTOP3 α*) gene expression, which catalyses changes in the topological form of DNA (Han et al., 2001). Modification of DNA supercoil structure allows chromatin accessibility and modulation of gene expression.

Taken together, these data describe USF-1 as a crucial and general transcription factor having multiple roles during transcription regulation, consistent with its ubiquitous expression and broad distribution of its cognate E-box motif across the genome. Consistent with this, the number of USF-1-dependent genes is extremely high with some playing a critical role during development and in the adult. Indeed, *USF-1/USF-2* double knock-out mice display an embryonic-lethal phenotype, suggesting that a minimal USF activity is essential for embryonic development.

USF-1 a stress-responsive factor

USF-1 and the tanning response in melanocytes

Skin cells are the first line of defence protecting the organism against a variety of chemical, physical and biological hazards. Solar ultraviolet radiation is a major environmental hazard and can cause skin inflammation, ageing and oncogenesis. Melanocytes protect against UV-mediated DNA damage through the tanning response in which UV irradiation triggers melanocyte production of melanin. Melanin synthesis takes place in specific organelles termed melanosomes that are transferred to neighbouring keratinocytes, thereby generating a protective skin screen. Melanin production is the result of a complex signalling network involving paracrine factors secreted by the keratinocytes [α -melanocyte specific hormone (MSH) encoded by the *POMC* gene, endothelin and FGF-2], specific receptors (melanocortin 1 receptor MC1R, endothelin B receptor EDNRB, tyrosine kinase receptors respectively) and transcription factors (Mitf, USF-1) as well as genes directly involved in pigment manufacture (*Tyrosinase*, *TRP-1* and *Dct*) (Hirobe, 2005; Kadokaro et al., 2003). Although the Mitf transcription factor is required for constitutive pigmentation

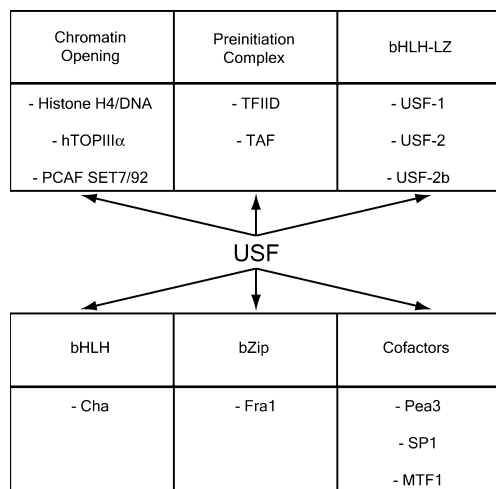


Figure 2. Upstream stimulating factor-1 transcriptional cooperation.

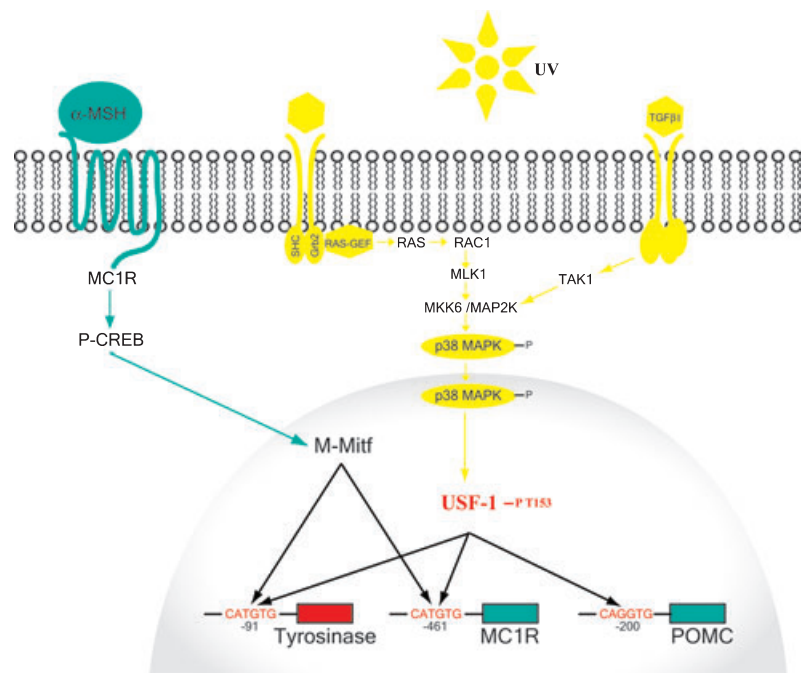


Figure 3. Upstream stimulating factor-1 and UV-induced pigmentation. In response to UV, activation of the p38 kinase allows USF-1 phosphorylation on threonine 153. Binding of the phosphorylated-USF-1 protein to specific-E-box motifs on tyrosinase, POMC and MC1R promoter genes induce gene expression.

(Busca and Ballotti, 2000), the p38-stress activated USF-1 transcription factor is necessary for the tanning response. Indeed, both are member of the b-HLH-LZ family and bind to E-box regulatory elements, and both are target proteins of the stress-activated p38 kinase (Galibert et al., 2001; Mansky et al., 2002; Vance and Goding, 2004), leading to the idea that Usf-1 and Mitf may act in concert or sequentially to activate UV-responsive genes (Vance and Goding, 2004). However, USF-1 is a critical UV-responsive activator of *POMC*, *MC1R*, *Tyrosinase*, *TYRP-1* and *Dct* genes (Figure 3). Indeed, these genes failed to be activated following UV stimulation in USF1 $-/-$ melanocyte cell line (Corre et al., 2004). Moreover, although *endothelin* and *FGF-2* UV-induced expression is USF-1 independent, they both activate p38 kinase in synergy with α -MSH, leading to a potential increase in USF-1 activity. The presence of this positive-feedback loop in the tanning response to UV-irradiation participates in the accumulation of protective pigment (Figure 3).

USF-1 and the immune response

The identification of USF-1 as a stress-responsive transcription factor is important in understanding the global transcriptional response to cellular stress. An increasing number of USF-1-regulated genes are implicated in the immune response following viral and bacterial infections. Two broad classes of immune response in which USF-1 participates can be described: the humoral-antibody response mediated by B-cell production of immunoglobulin (Ig), and the cell-mediated immune response involving the cytotoxic and helper T-lymphocytes (Figure 4).

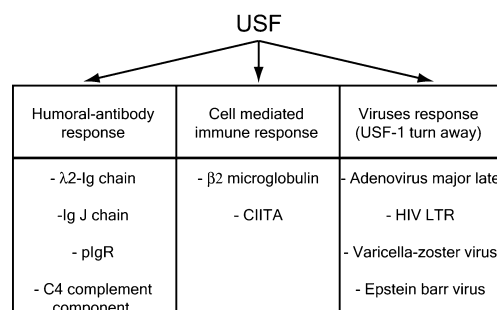


Figure 4. Upstream stimulating factor and the immune response.

E-box motifs are critical regulatory elements within the enhancers and promoters of Ig chain genes (Ephrussi et al., 1985). USF-1 has thus been shown to bind and promote transcription of the λ 2-Ig light chain gene (Chang et al., 1992), while TFE3 is thought to bind the μ E3 E-box within the Ig heavy-chain enhancer gene (Carter et al., 1997). Interestingly, a 50-bp repeat (VNTR) within the D/J interval of the Ig heavy chain locus presents an E-box-binding element. This VNTR, which is entirely deleted during D/J rearrangement in B-cell differentiation, is thought to interact and sequester transcription factors, potentially USF, before B-cell differentiation and Ig-gene expression (Trepicchio and Krontiris, 1993). During the primary immune response, IgM pentamer formation is dependent on the synthesis of the Ig J chain, which links the IgM monomers. Efficient J chain transcription in activated B cells is dependent on USF factors in combination with other regulatory elements (Wallin et al., 1999). Polymeric IgA

and IgM antibodies are transported across mucosal and glandular epithelia by polymeric Ig receptors (pIgRs) to mediate the host defence. One molecule of pIgR must be synthesized for each molecule of Ig. Therefore, the expression of pIgR must be strictly regulated during B-cell activation, and has been shown to be dependent on USF proteins. Indeed, chromatin immunoprecipitation shows that USF proteins interact in vivo with the pIgR gene promoter (Bruno et al., 2004; Martin et al., 2003).

Circulating Ig binds specifically to foreign antigens targeting them for destruction either by phagocytosis or by activating the complement system. USF-1 participates in this immune response phase by regulating the C4 complement component gene expression (Galibert et al., 1997). USF-1 also regulates β 2-microglobulin transactivation, which encodes a glycoprotein associated with the major histocompatibility class I complex molecules that play a central role in antigen presentation and in Ig transport (Gobin et al., 2003; Howcroft et al., 1999). USF-1 binds and activates the CIITA gene promoter, which is required by MHC class II gene induction by interferon-gamma, involved in cellular immunity (Muhlethaler-Mottet et al., 1998). Together, these data clearly show that USF-1 is a key regulator of the immune response.

Given the important role of USF factors in the immune response it is perhaps not surprising that a variety of pathogens make use of USF for their own ends. For example, *Chlamydia*, which are obligate intracellular pathogens, can escape T lymphocyte immune recognition by degrading the host USF-1 transcription factor required for class I and II MHC antigen expression in the infected cells (Zhong et al., 1999, 2001). Viruses have also evolved to manipulate and divert to their own benefit host responses following infection and use USF-1 for key roles during the virus replication cycle. Thus, USF is involved in transcriptional regulation of the AdML promoter (Gregor et al., 1990), of the HIV LTR (Giacca et al., 1992; Maekawa et al., 1991; Sieweke et al., 1998), Varicella-zoster virus (Meier et al., 1994) and Epstein-Barr virus (Liu et al., 1996), perhaps taking advantage of the USF as a factor activated by the kind of stress that might be triggered by viral infection. Furthermore, data suggest that USF-1 interacts also with the transcriptional virus machinery to enhance transcription at the E-box motif. Cooperation of USF-1 with the varicella-zoster virus immediate-early protein 62 (IE62) requires the DNA-binding domain and transcriptional activation domains of USF (Meier et al., 1994). Activation of the cellular p38 stress signalling pathway following viral infection (Zachos et al., 1999) may lead to efficient activation of USF factors which are then recruited for viral gene expression. Therefore, USF proteins are versatile transcription factors allowing both immune responses and pathogens proliferation.

USF and the cell cycle

Regulation of the cell cycle is a critical process that allows the correct timing and order of events prior to cell division. The progression of the cell cycle is thus strictly regulated to maintain genetic integrity and to ensure that genetic information is correctly passed on to daughter cells. Cyclin-dependent kinases (Cdks) and their activating subunits, the cyclins, are the driving force allowing cell cycle progression. During the cell cycle, kinase levels change as a result of a combination of gene transcription and subsequent proteolysis by the ubiquitin-proteasome system leading to regulation of S and M phases by different subsets of cyclin-cdk complexes. Regulation of the G1/S progression-transition is dependent on cyclins D and E in combination with Cdk2, Cdk4 and Cdk6, whereas the G2/M progression-transition is dependent on cyclins A and B in combination with Cdk1 (cdc2) (Hunt, 1991). The cyclin-cdk complexes are crucial to the continued and timely progression through the cell-cycle and are regulated by various mechanisms, including Cdks inhibitors (Peter and Herskowitz, 1994). USF transcription factors are involved at both the G1/S and G2/M transitions by regulating the expression of diverse cyclin and Cdk genes (Cogswell et al., 1995; North et al., 1999; Pawar et al., 2004; Philipp et al., 1994) (Figure 5). For example, *CDK4* is a direct target of both USF-2 and the c-Myc b-HLH-LZ proteins and the evidence suggests that these two transcription factors bind simultaneously to distinct and adjacent E-box motifs within the *CDK4* promoter, cooperatively activating transcription in non-tumourigenic breast epithelial cells (Pawar et al., 2004). In some breast cancer cell lines, where c-Myc is expressed at high levels and USF is transcriptionally inactive, *CDK-4* expression has been shown then to be independent of both USF and c-Myc transcription factors.

The USF-1 transcription factor is also found to be a positive regulator of *cyclin B1* and *Cdk-1* gene expression (Cogswell et al., 1995; North et al., 1999). *Cyclin B1* is expressed between the late S and G2 phases of the cell cycle with Cdk-1 being activated by phosphorylation and by sufficient cyclin B proteins being

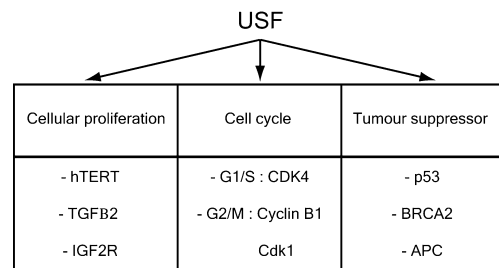


Figure 5. Upstream stimulating factor and cell proliferation.

synthesized, promoting entry into the M phase. Phosphorylation of recombinant USF-1 by active cyclin-cdk complexes (cyclinA2-cdk1 and cyclinB1-cdk1) has been shown to increase its DNA-binding activity (Cheung et al., 1999), which suggests a positive amplification loop favouring the G2/M transition.

Antiproliferative properties of the USF family on transformed cells

The involvement of the USF family in cellular growth control has been studied using focus and colony-formation assays (Aperlo et al., 1996; Luo and Sawadogo, 1996) in which the USF family was shown to inhibit the transformation of primary rat cells mediated by c-Myc and Ras. This highlights the fact that although USF and Myc proteins share homologous bHLH-LZ domains, they have opposite roles in cellular transformation. In addition, only USF-2 was able to abolish E1A and Ras, or mutant p53 and Ras-induced focus formation of rat primary cells, demonstrating that despite their similarities, USF-1 and USF-2 does not possess redundant functions in regards with these genes (Luo and Sawadogo, 1996). The molecular process underlying the anti-proliferative properties of the USF proteins was shown to be dependent on USF-DNA binding activity, allowing interaction and regulation of target promoters. This is consistent with the fact that some USF-target genes are involved in the control of cellular proliferation and differentiation (Figure 5); USF transcription factors participate in the regulation of cyclin-cdk encoding genes, tumour suppressor genes, and growth factor networks (Kingsley-Kallesen et al., 1999; Szentirmay et al., 2003). Although the integrity of the USF DNA-binding domain is necessary to confer its anti-proliferative properties, it is not sufficient as they also require full transcriptional activity. In this respect, over expression of recombinant-USF proteins in HeLa cells causes marked growth inhibition, whereas no effect was observed in Saos-2 cells. Analysis of USF activity in both cell lines showed that the Saos-2 cells lacked transcriptionally active USF-1 and USF-2 forms (Qyang et al., 1999). Thus the transcriptional activity of USF proteins appears to be context dependent and may indicate that modulation of USF activity by transcriptional co-activators or post-translational modifications may be cell-type specific. If the USF family is indeed involved in the control of cell proliferation, de-regulation of USF family members should occur in cancer cells, contributing to uncontrolled proliferation. In support of this notion, loss of USF transcriptional activity has been observed in three of six transformed breast cell lines (Ismail et al., 1999) highlighting the potential of importance of USF family in cell proliferation control.

Expression of the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene, which is necessary to avoid telomere shortening and cell crisis, is a major determinant

of cellular longevity. Upregulation of *hTERT* transcription is observed in more than 85% of tumour cells, whereas its expression is shut down in most somatic cells. Several transcription factors are thought to regulate *TERT* expression and activation of *TERT* expression by b-HLH-LZ proteins involving Myc and USF subfamily members has been demonstrated (Goueli and Janknecht, 2003; Horikawa et al., 2002; Yago et al., 2002). The effect of USF proteins on *hTERT* regulation in tumour cells has been studied using *hTERT*-positive and *hTERT*-negative tumour cell lines (Goueli and Janknecht, 2003). USF-1 and USF-2 heterodimers interact in vivo and in vitro with E-box motifs within the *hTERT* promoter and USF proteins bind to promoters in both *hTERT*-positive and negative cells. However, stimulation of *hTERT* gene expression is observed only in *hTERT*-positive cell lines. In non-immortalized *hTERT*-negative cells, USF binding to the *hTERT* promoter is transcriptionally neutral. Therefore, on their own, USF proteins are unable to re-activate *hTERT* expression in *hTERT*-negative cells. Precisely how the feedback between USF and *hTERT* occurs is currently unknown, but through *hTERT* transactivation, USF proteins can, depending on the cell context, contribute to the maintenance of cell immortality.

USF and tumour suppressor genes

Importantly, given its proposed role in regulation of *hTERT* and in regulation of proliferation and transformation, distinct tumour suppressor genes, including p53, BRCA2 and APC, have also been shown to be direct targets of the USF transcription factors (Figure 5) (Davis et al., 1999; Hale and Braithwaite, 1995; Jaiswal and Narayan, 2001; Reisman and Rotter, 1993). The p53 tumour suppressor gene functions as a transcription factor (Levine et al., 1991) and plays a major role in regulating the response of mammalian cells to stress and damage, partly through transcriptional activation of genes involved in cell cycle control, DNA repair and apoptosis. In response to myriad stresses (DNA damage, hypoxia, proliferative signals, etc.), it is well established that the p53 protein becomes stabilized, causing cells to undergo either cell cycle arrest or apoptosis. Concomitant to DNA-damage, stress activated USF-1 factor would participate in DNA-repair through p53 and *BRCA2* gene regulation (Davis et al., 1999; Hale and Braithwaite, 1995; Reisman and Rotter, 1993). As loss of function of tumour suppressor genes participates in the development of carcinogenesis, loss or reduced activity of USF, either via abrogation of the protein/DNA complex through E-box modification (mutation or methylation) or alteration of the USF transcriptional activity (post-translational modification, protein/protein interaction) could also in principle contribute to transformation, by leading to reduced p53 expression for example.

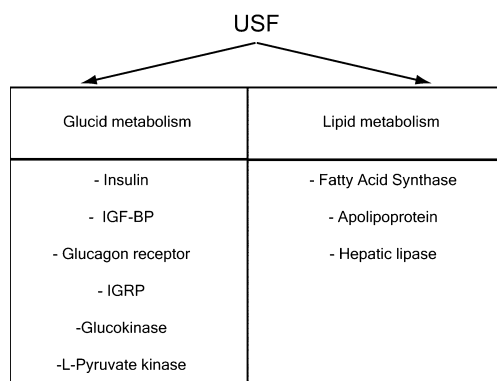


Figure 6. Upstream stimulating factor and glucid–lipid metabolisms.

USF and glucid–lipid metabolism

In addition to their multiple roles in regulating proliferation, an additional function of USF factors is in glucid and lipid metabolism (Figure 6), where they regulate a wide number of genes characterized by the presence of E-box motifs within their promoter regions. USF-1 participates, among others, in the regulation of the insulin gene (Read et al., 1993), the insulin growth factor-binding protein 1 gene (*IGF-BP1*) (Matsukawa et al., 2001), the glucagon receptor gene (Portois et al., 2002), the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related gene (Martin et al., 2003), and the glucokinase gene, which are critical elements in hepatic glucose sensing (Iynedjian, 1998; Roth et al., 2004). Moreover, disruption of the genes in mice allowed the implication the USF factors in regulation of the *L-Pyruvate Kinase* (*L-PK*) gene. The hepatic USF binding activity in USF-1 and -2 KO mice is then accounted by the remaining USF-homodimer species (Vallet et al., 1997, 1998). USF-1 is also largely involved in lipogenesis, regulating among others fatty acid synthase, apolipoprotein, hepatic lipase, acetyl-CoA and carboxylase genes. Finally, familial combined hyperlipidaemia (FCHL), characterized by elevated levels of total cholesterol and/or triglycerides, was recently linked and associated to the *USF-1* gene (Coon et al., 2005; Pajukanta et al., 2004). Additional studies (Elbein et al., 1999; Putt et al., 2004) suggest that the involvement of USF-1 in lipid and glucose metabolism may not be limited to FCHL and may be linked to other diseases such as type 2 diabetes.

Conclusions

Upstream stimulating factor proteins are stress-responsive b-HLH-LZ factors that regulate a wide range of target promoters through specific-E-box motifs. Identification of the repertoire of cellular genes that are regulated by USF has been complicated by the fact that E-box motifs are widely represented across the genome

and because the majority of E-box-binding sites can also be recognized by other b-HLH-LZ members, including the Myc and Mitf families. Nevertheless, the number of genes known to be regulated by USF transcription factors is constantly expanding while it has become clear that USF DNA-binding and activity is subject to regulation through several pathways, most notably by stress-activated signalling. Despite these advances several key questions remain to be answered. For example, do the various post-translational modifications of USF leads to exchange of co-factors used by USF to mediate gene regulation, and indeed what is the full repertoire of co-factors recruited by USF proteins to target promoters? For genes where E-boxes are recognized by both USF and other transcription factors, is recognition sequential and which binds first? For example, it is possible that USF factors play a key role in maintaining a chromatin environment at a promoter that is critically required for other factors to regulate transcription. In addition, there is some evidence for apparently conflicting roles of USF as USF family members can either allow progression through the cell cycle by activating cyclin-cdk gene expression, or repress the cell cycle by regulating tumour suppressor genes; and if USF is an anti-proliferative factor, why does USF regulate *hTERT* gene expression in cancer cells? Most likely many aspects of USF function will be cell type and context dependent and indeed, like many other factors, it may even switch from activator to repressor depending on which signal transduction pathways are operating at a given time. Thus, despite the increasing evidence that USF plays a key role in many aspects of cell division and proliferation, there remains a great deal to learn.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. M. Philippe and Prof. F. Galibert for critical reading of the manuscript. We apologize to those whose work was not cited because of space limitations.

References

- Aksan, I., and Goding, C.R. (1998). Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6930–6938.
- Andrews, G.K., Lee, D.K., Ravindra, R., Lichtlen, P., Sirito, M., Sawadogo, M., and Schaffner, W. (2001). The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *Embo. J.* **20**, 1114–1122.
- Aperlo, C., Boulukos, K.E., and Pognonec, P. (1996). The basic region/helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF interferes with Ras transformation. *Eur. J. Biochem.* **241**, 249–253.
- Atchley, W.R., and Fitch, W.M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5172–5176.

- Ayer, D.E., Kretzner, L., and Eisenman, R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211–222.
- Baxevanis, A.D., and Vinson, C.R. (1993). Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 278–285.
- Beckmann, H., Su, L.K., and Kadesch, T. (1990). TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev.* 4, 167–179.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49–59.
- Blackwell, T.K., and Weintraub, H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104–1110.
- Blackwell, T.K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F.W., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5216–5224.
- Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211–1217.
- Breathnach, R., and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349–383.
- Bruno, M.E., West, R.B., Schneeman, T.A., Bresnick, E.H., and Kaetzel, C.S. (2004). Upstream stimulatory factor but not c-Myc enhances transcription of the human polymeric immunoglobulin receptor gene. *Mol. Immunol.* 40, 695–708.
- Bungert, J., Kober, I., Doring, F., and Seifart, K.H. (1992). Transcription factor eUSF is an essential component of isolated transcription complexes on the duck histone H5 gene and it mediates the interaction of TFIID with a TATA-deficient promoter. *J. Mol. Biol.* 223, 885–898.
- Busca, R., and Ballotti, R. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell. Res.* 13, 60–69.
- Busch, S.J., and Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet.* 6, 36–40.
- Carr, C.S., and Sharp, P.A. (1990). A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4384–4388.
- Carter, R.S., Ordentlich, P., and Kadesch, T. (1997). Selective utilization of basic helix-loop-helix-leucine zipper proteins at the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 17, 18–23.
- Carthew, R.W., Chodosh, L.A., and Sharp, P.A. (1985). An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* 43, 439–448.
- Casado, M., Vallet, V.S., Kahn, A., and Vaulont, S. (1999). Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J. Biol. Chem.* 274, 2009–2013.
- Chang, L.A., Smith, T., Pognonec, P., Roeder, R.G., and Murialdo, H. (1992). Identification of USF as the ubiquitous murine factor that binds to and stimulates transcription from the immunoglobulin lambda 2-chain promoter. *Nucleic Acids Res.* 20, 287–293.
- Cheung, E., Mayr, P., Coda-Zabetta, F., Woodman, P.G., and Boam, D.S. (1999). DNA-binding activity of the transcription factor upstream stimulatory factor 1 (USF-1) is regulated by cyclin-dependent phosphorylation. *Biochem. J.* 344 (Pt 1), 145–152.
- Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531–536.
- Ciarapica, R., Rosati, J., Cesareni, G., and Nasi, S. (2003). Molecular recognition in helix-loop-helix and helix-loop-helix-leucine zipper domains. Design of repertoires and selection of high affinity ligands for natural proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 12182–12190.
- Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Bonham, M., Bisi, J., and Babiss, L. (1995). Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2782–2790.
- Coon, H., Xin, Y., Hopkins, P.N., Cawthon, R.M., Hasstedt, S.J., and Hunt, S.C. (2005). Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides. *Hum. Genet.* doi: 10.1007/s00439-005-1340-x.
- Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D.C., Vaulont, S., Goding, C.R., and Galibert, M.D. (2004). UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38 activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J. Biol. Chem.* 279, 51226–51233.
- Dang, C.V., Dolde, C., Gillison, M.L., and Kato, G.J. (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 599–602.
- Davis, P.L., Miron, A., Andersen, L.M., Iglehart, J.D., and Marks, J.R. (1999). Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene* 18, 6000–6012.
- Du, H., Roy, A.L., and Roeder, R.G. (1993). Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the Ad-ML promoters. *Embo. J.* 12, 501–511.
- Elbein, S.C., Hoffman, M.D., Teng, K., Leppert, M.F., and Hasstedt, S.J. (1999). A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes* 48, 1175–1182.
- Ellis, H.M., Spann, D.R., and Posakony, J.W. (1990). extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27–38.
- Ephrussi, A., Church, G.M., Tonegawa, S., and Gilbert, W. (1985). B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 227, 134–140.
- Ferre-D'Amare, A.R., Pognonec, P., Roeder, R.G., and Burley, S.K. (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *Embo. J.* 13, 180–189.
- Ferreiro, J.A., Powell, N.G., Karabetsou, N., Kent, N.A., Mellor, J., and Waters, R. (2004). Cbf1p modulates chromatin structure, transcription and repair at the *Saccharomyces cerevisiae* MET16 locus. *Nucleic Acids Res.* 32, 1617–1626.
- Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y., and Chotteau-Lelievre, A. (2005). Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J. Biol. Chem.* 280, 887–898.
- Fisher, F., Crouch, D.H., Jayaraman, P.S., Clark, W., Gillespie, D.A., and Goding, C.R. (1993). Transcription activation by Myc and Max: flanking sequences target activation to a subset of CACGTG motifs in vivo. *Embo. J.* 12, 5075–5082.
- Galibert, M.D., Miyagoe, Y., and Meo, T. (1993). E-box activator of the C4 promoter is related to but distinct from the transcription factor upstream stimulating factor. *J. Immunol.* 151, 6099–6109.
- Galibert, M.D., Boucontet, L., Goding, C.R., and Meo, T. (1997). Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor. *J. Immunol.* 159, 6176–6183.
- Galibert, M.D., Carreira, S., and Goding, C.R. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced tyrosinase expression. *Embo. J.* 20, 5022–5031.
- Gao, E., Wang, Y., Alcorn, J.L., and Mendelson, C.R. (1997). The basic helix-loop-helix-zipper transcription factor USF1 regulates

- expression of the surfactant protein-A gene. *J. Biol. Chem.* 272, 23398–23406.
- Ge, Y., Jensen, T.L., Matherly, L.H., and Taub, J.W. (2003). Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J. Biol. Chem.* 278, 49901–49910.
- Giacca, M., Gutierrez, M.I., Menzo, S., d'Adda di Fagagna, F., and Falaschi, A. (1992). A human binding site for transcription factor USF/MLTF mimics the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 186, 133–147.
- Gobin, S.J., Biesta, P., and Van den Elsen, P.J. (2003). Regulation of human beta 2-microglobulin transactivation in hematopoietic cells. *Blood* 101, 3058–3064.
- Goueli, B.S., and Janknecht, R. (2003). Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene* 22, 8042–8047.
- Gregor, P.D., Sawadogo, M., and Roeder, R.G. (1990). The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* 4, 1730–1740.
- Griswold, M.D., and Kim, J.S. (2001). Site-specific methylation of the promoter alters deoxyribonucleic acid-protein interactions and prevents follicle-stimulating hormone receptor gene transcription. *Biol. Reprod.* 64, 602–610.
- Groenen, P.M., Garcia, E., Debeer, P., Devriendt, K., Frys, J.P., and Van de Ven, W.J. (1996). Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia. *Genomics* 38, 141–148.
- Halazonetis, T.D., and Kandil, A.N. (1991). Determination of the c-MYC DNA-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6162–6166.
- Hale, T.K., and Braithwaite, A.W. (1995). Identification of an upstream region of the mouse p53 promoter critical for transcriptional expression. *Nucleic Acids Res.* 23, 663–669.
- Han, S.Y., Kim, J.C., Suh, J.M., and Chung, I.K. (2001). Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2. *FEBS Lett.* 505, 57–62.
- Henrion, A.A., Martinez, A., Mattei, M.G., Kahn, A., and Raymondjean, M. (1995). Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse. *Genomics* 25, 36–43.
- Henrion, A.A., Vaulont, S., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1996). Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family. *Mamm. Genome* 7, 803–809.
- Hirobe, T. (2005). Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 18, 2–12.
- Horikawa, I., Cable, P.L., Mazur, S.J., Appella, E., Afshari, C.A., and Barrett, J.C. (2002). Downstream E-box-mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression. *Mol. Biol. Cell.* 13, 2585–2597.
- Howcroft, T.K., Murphy, C., Weissman, J.D., Huber, S.J., Sawadogo, M., and Singer, D.S. (1999). Upstream stimulatory factor regulates major histocompatibility complex class I gene expression: the U2DeltaE4 splice variant abrogates E-box activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4788–4797.
- Hunt, T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell. Biol.* 2, 213–222.
- Ismail, P.M., Lu, T., and Sawadogo, M. (1999). Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines. *Oncogene* 18, 5582–5591.
- lynedjian, P.B. (1998). Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene. *Biochem. J.* 333 (Pt 3), 705–712.
- Jaiswal, A.S., and Narayan, S. (2001). Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene. *J. Cell. Biochem.* 81, 262–277.
- Kadekaro, A.L., Kavanagh, R.J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M.A., and Abdel-Malek, Z.A. (2003). Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res.* 16, 434–447.
- Kaulen, H., Pognonec, P., Gregor, P.D., and Roeder, R.G. (1991). The *Xenopus* B1 factor is closely related to the mammalian activator USF and is implicated in the developmental regulation of TFIIIA gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11, 412–424.
- Kingsley-Kallesen, M.L., Kelly, D., and Rizzino, A. (1999). Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta2 promoter by cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and activating transcription factor-1 (ATF-1) is modulated by protein kinases and the coactivators p300 and CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 34020–34028.
- Kirschbaum, B.J., Pognonec, P., and Roeder, R.G. (1992). Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43-kilodalton USF. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5094–5101.
- Kophengnavong, T., Michnowicz, J.E., and Blackwell, T.K. (2000). Establishment of distinct MyoD, E2A, and twist DNA binding specificities by different basic region-DNA conformations. *Mol. Cell. Biol.* 20, 261–272.
- Kozlowski, M.T., Gan, L., Venuti, J.M., Sawadogo, M., and Klein, W.H. (1991). Sea urchin USF: a helix-loop-helix protein active in embryonic ectoderm cells. *Dev. Biol.* 148, 625–630.
- Kumari, D., and Usdin, K. (2001). Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha-Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. *J. Biol. Chem.* 276, 4357–4364.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453–456.
- Lin, Q., Luo, X., and Sawadogo, M. (1994). Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF. *J. Biol. Chem.* 269, 23894–23903.
- Liu, C., Sista, N.D., and Pagano, J.S. (1996). Activation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase promoter by the BRLF1 immediate-early protein is mediated through USF and E2F. *J. Virol.* 70, 2545–2555.
- Liu, M., Whetstone, J.R., Payton, S.G., Ge, Y., Flatley, R.M., and Matherly, L.H. (2004). Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem. J.* 383, 249–257.
- Luo, X., and Sawadogo, M. (1996). Functional domains of the transcription factor USF2: atypical nuclear localization signals and context-dependent transcriptional activation domains. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1367–1375.
- Maekawa, T., Sudo, T., Kurimoto, M., and Ishii, S. (1991). USF-related transcription factor, HIV-TF1, stimulates transcription of human immunodeficiency virus-1. *Nucleic Acids Res.* 19, 4689–4694.
- Majumder, S., Ghoshal, K., Li, Z., and Jacob, S.T. (1999). Hypermethylation of metallothionein-I promoter and suppression of its induction in cell lines overexpressing the large subunit of Ku protein. *J. Biol. Chem.* 274, 28584–28589.
- Mandola, M.V., Stoehlmacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M.C., Lenz, H.J., and Ladner, R.D. (2003). A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.* 63, 2898–2904.
- Mansky, K.C., Sankar, U., Han, J., and Ostrowski, M.C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 11077–11083.

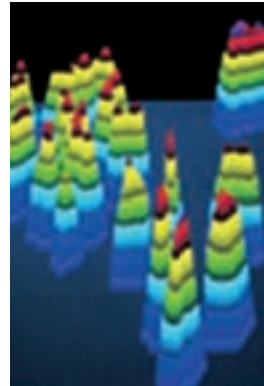
- Martin, C.C., Svitek, C.A., Oeser, J.K., Henderson, E., Stein, R., and O'Brien, R.M. (2003). Upstream stimulatory factor (USF) and neurogenic differentiation/beta-cell E box transactivator 2 (NeuroD/BETA2) contribute to islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic-subunit-related protein (IGRP) gene expression. *Biochem. J.* **371**, 675–686.
- Matsukawa, T., Inoue, Y., Oishi, Y., Kato, H., and Noguchi, T. (2001). Up-regulation of upstream stimulatory factors by protein malnutrition and its possible role in regulation of the IGF-binding protein-1 gene. *Endocrinology* **142**, 4643–4651.
- Meier, J.L., Luo, X., Sawadogo, M., and Straus, S.E. (1994). The cellular transcription factor USF cooperates with varicella-zoster virus immediate-early protein 62 to symmetrically activate a bidirectional viral promoter. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6896–6906.
- Meisterernst, M., Horikoshi, M., and Roeder, R.G. (1990). Recombinant yeast TFIIID, a general transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9153–9157.
- Moncollin, V., Miyamoto, N.G., Zheng, X.M., and Egly, J.M. (1986). Purification of a factor specific for the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *Embo. J.* **5**, 2577–2584.
- Muhlethaler-Mottet, A., Di Bernardino, W., Otten, L.A., and Mach, B. (1998). Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* **8**, 157–166.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H. et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537–544.
- North, S., Espanel, X., Bantignies, F., Viollet, B., Vallet, V., Jalinet, P., Brun, G., and Gillet, G. (1999). Regulation of *cdc2* gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). *Oncogene* **18**, 1945–1955.
- Nowak, M., Helleboid-Chapman, A., Jakel, H. et al. (2005). Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1537–1548.
- Pajukanta, P., Lilja, H.E., Sinsheimer, J.S. et al. (2004). Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat. Genet.* **36**, 371–376.
- Pawar, S.A., Szentirmay, M.N., Hermeking, H., and Sawadogo, M. (2004). Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene* **23**, 6125–6135.
- Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79**, 181–184.
- Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Altalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4032–4043.
- Pognonec, P., Boulukos, K.E., Aperlo, C., Fujimoto, M., Ariga, H., Nomoto, A., and Kato, H. (1997). Cross-family interaction between the bHLHZip USF and bZip Fra1 proteins results in down-regulation of AP1 activity. *Oncogene* **14**, 2091–2098.
- Portois, L., Tastenoy, M., Viollet, B., and Svoboda, M. (2002). Functional analysis of the glucose response element of the rat glucagon receptor gene in insulin-producing INS-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1574**, 175–186.
- Prendergast, G.C., and Ziff, E.B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* **251**, 186–189.
- Putt, W., Palmen, J., Nicaud, V., Tregouet, D.A., Tahri-Daizadeh, N., Flavell, D.M., Humphries, S.E., and Talmud, P.J. (2004). Variation in USF1 shows haplotype effects, gene: gene and gene: environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1587–1597.
- Qyang, Y., Luo, X., Lu, T., Ismail, P.M., Krylov, D., Vinson, C., and Sawadogo, M. (1999). Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1508–1517.
- Read, M.L., Clark, A.R., and Docherty, K. (1993). The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer. *Biochem. J.* **295** (Pt 1), 233–237.
- Reisman, D., and Rotter, V. (1993). The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res.* **21**, 345–350.
- Rodriguez, C.I., Girones, N., and Fresno, M. (2003). Cha, a basic helix-loop-helix transcription factor involved in the regulation of upstream stimulatory factor activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 43135–43145.
- Roth, U., Jungermann, K., and Kietzmann, T. (2004). Modulation of glucokinase expression by hypoxia-inducible factor 1 and upstream stimulatory factor 2 in primary rat hepatocytes. *Biol. Chem.* **385**, 239–247.
- Roy, A.L., Meisterernst, M., Pognonec, P., and Roeder, R.G. (1991). Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* **354**, 245–248.
- Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T., and Roeder, R.G. (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* **365**, 359–361.
- Roy, A.L., Du, H., Gregor, P.D., Novina, C.D., Martinez, E., and Roeder, R.G. (1997). Cloning of an inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *Embo. J.* **16**, 7091–7104.
- Saito, T., Oishi, T., Yanai, K., Shimamoto, Y., and Fukamizu, A. (2003). Cloning and characterization of a novel splicing isoform of USF1. *Int. J. Mol. Med.* **12**, 161–167.
- Sato, M., Fukushi, Y., Ishizawa, S., Okinaga, S., Muller, R.M., and Shibahara, S. (1989). Transcriptional control of the rat heme oxygenase gene by a nuclear protein that interacts with adenovirus 2 major late promoter. *J. Biol. Chem.* **264**, 10251–10260.
- Sawadogo, M. (1988). Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J. Biol. Chem.* **263**, 11994–12001.
- Sawadogo, M., and Roeder, R.G. (1985). Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**, 165–175.
- Sawadogo, M., Van Dyke, M.W., Gregor, P.D., and Roeder, R.G. (1988). Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **263**, 11985–11993.
- Sha, M., Ferre-D'Amare, A.R., Burley, S.K., and Goss, D.J. (1995). Anti-cooperative biphasic equilibrium binding of transcription factor upstream stimulatory factor to its cognate DNA monitored by protein fluorescence changes. *J. Biol. Chem.* **270**, 19325–19329.
- Shieh, B.H., Sparkes, R.S., Gaynor, R.B., and Lusis, A.J. (1993). Localization of the gene-encoding upstream stimulatory factor (USF) to human chromosome 1 q22-q23. *Genomics* **16**, 266–268.
- Sieweke, M.H., Tekotte, H., Jarosch, U., and Graf, T. (1998). Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *Embo. J.* **17**, 1728–1739.
- Sirito, M., Walker, S., Lin, Q., Kozlowski, M.T., Klein, W.H., and Sawadogo, M. (1992). Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr.* **2**, 231–240.

- Sirito, M., Lin, Q., Maity, T., and Sawadogo, M. (1994). Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *22*, 427–433.
- Sirito, M., Lin, Q., Deng, J.M., Behringer, R.R., and Sawadogo, M. (1998). Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 3758–3763.
- Smale, S.T., and Baltimore, D. (1989). The “initiator” as a transcription control element. *Cell* *57*, 103–113.
- Szentirmay, M.N., Yang, H.X., Pawar, S.A., Vinson, C., and Sawadogo, M. (2003). The IGF2 receptor (IGF2R) is a USF2-specific target in nontumorigenic mammary epithelial cells, but not in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 37231–37240.
- Tassabehji, M., Newton, V.E., and Read, A.P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* *8*, 251–255.
- Trepicchio, W.L., and Krontiris, T.G. (1993). IGH minisatellite suppression of USF-binding-site- and E mu-mediated transcriptional activation of the adenovirus major late promoter. *Nucleic Acids Res.* *21*, 977–985.
- Vallet, V.S., Henrion, A.A., Bucchini, D., Casado, M., Raymondjean, M., Kahn, A., and Vaulont, S. (1997). Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 *-/-* mice. *J. Biol. Chem.* *272*, 21944–21949.
- Vallet, V.S., Casado, M., Henrion, A.A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A., and Vaulont, S. (1998). Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J. Biol. Chem.* *273*, 20175–20179.
- Vance, K.W., and Goding, C.R. (2004). The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res.* *17*, 318–325.
- Vettese-Dadey, M., Grant, P.A., Hebbes, T.R., Crane-Robinson, C., Allis, C.D., and Workman, J.L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo. J.* *15*, 2508–2518.
- Viollet, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Henrion, A., Kahn, A., Raymondjean, M., and Martinez, A. (1996). Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J. Biol. Chem.* *271*, 1405–1415.
- Wallin, J.J., Rinkenberger, J.L., Rao, S., Gackstetter, E.R., Koshland, M.E., and Zwollo, P. (1999). B cell-specific activator protein prevents two activator factors from binding to the immunoglobulin J chain promoter until the antigen-driven stages of B cell development. *J. Biol. Chem.* *274*, 15959–15965.
- Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* *2*, 1136–1143.
- West, A.G., Huang, S., Gaszner, M., Litt, M.D., and Felsenfeld, G. (2004). Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol. Cell* *16*, 453–463.
- Xiao, Q., Kenessey, A., and Ojamaa, K. (2002). Role of USF1 phosphorylation on cardiac alpha-myosin heavy chain promoter activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *283*, H213–H219.
- Yago, M., Ohki, R., Hatakeyama, S., Fujita, T., and Ishikawa, F. (2002). Variant forms of upstream stimulatory factors (USFs) control the promoter activity of hTERT, the human gene encoding the catalytic subunit of telomerase. *FEBS Lett.* *520*, 40–46.
- Yasumoto, K., and Shibahara, S. (1997). Molecular cloning of cDNA encoding a human TFEC isoform, a newly identified transcriptional regulator. *Biochim. Biophys. Acta* *1353*, 23–31.
- Zachos, G., Clements, B., and Conner, J. (1999). Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. *J. Biol. Chem.* *274*, 5097–5103.
- Zervos, A.S., Gyuris, J., and Brent, R. (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* *72*, 223–232.
- Zhong, G., Fan, T., and Liu, L. (1999). Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J. Exp. Med.* *189*, 1931–1938.
- Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F., and Huang, Y. (2001). Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J. Exp. Med.* *193*, 935–942.

> Les protéines USF-1 et -2 (*upstream stimulatory factor*) appartiennent à la super-famille de facteurs de transcription de type bHLH-LZ (*basic-helix-loop-helix-leucine zipper*) conservés au cours de l'évolution. Les protéines USF-1 et USF-2, respectivement de 43 et 44 kDa chez l'homme, sont ubiquitaires et se lient avec une haute affinité aux éléments de type « boîtes E » (CANNTG). Les facteurs de transcription USF participent à différents niveaux de la régulation de l'expression des gènes en permettant le recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine et en interagissant avec les co-activateurs et les membres du complexe de pré-initiation. Les facteurs USF sont ainsi des régulateurs clés de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse au stress, la réponse immunitaire, le cycle cellulaire et la prolifération. Cet article a pour objectif de présenter, de manière non exhaustive, les caractéristiques de ces facteurs ainsi que leur implication dans la transcription. <

USF : un régulateur essentiel de la transcription

Sébastien Corre, Marie-Dominique Galibert



CNRS UMR 6061,
 Laboratoire de génétique
 et développement,
 Faculté de Médecine,
 Université de Rennes 1,
 2, avenue
 du Professeur Léon Bernard,
 35043 Rennes Cedex, France.
mgaliber@univ-rennes1.fr

Les facteurs de transcription USF (*upstream stimulating factors*)

La purification biochimique des éléments de régulation en *trans* du promoteur majeur tardif de l'adénovirus (MLPA) [1] a permis d'identifier et de caractériser les facteurs de transcription USF-1 et -2 (*upstream stimulating factor 1, 2*), respectivement de 43 et 44 kDa [2, 3]. Ces protéines sont codées par deux gènes distincts *USF-1* et *USF-2*, localisés respectivement chez l'homme en 1q22-23 et 19q13 (*Figure 1A*) [4, 5]. L'organisation des gènes *USF-1* et -2 est comparable, avec 10 exons répartis sur 4 et 10 kb, respectivement (*Figure 1A*) [6]. Les facteurs USF-1 et -2 possèdent une homologie de séquence importante au niveau de leurs ADNc et de leurs protéines [7]. De même, le niveau de conservation des protéines entre espèces (homme, rat,

souris) est élevé, pouvant atteindre 99 % d'identité [8]. De fait, les protéines USF font partie de la super-famille des b-HLH-LZ (*basic-helix-loop-helix-leucine zipper*) [9] qui comprend, entre autres, les protéines eucaryotes des sous-familles Myc (Myc, Max, Mad, Mxi1), TFE3 (*transcription factor binding to IGHM enhancer 3*) (TFE3, TFEb, TFEc) et Mitf (*microphthalmia-associated transcription factor*). Les protéines b-HLH-LZ se caractérisent par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN (région basique) et de deux domaines de dimérisation (régions HLH et LZ) (*Figure 1B, 1C*). La présence des domaines HLH et LZ contigus distingue ces protéines des facteurs de transcription de type bHLH ou bZip qui ne possèdent qu'un seul domaine de dimérisation. La région basique est impliquée dans l'interaction avec l'ADN au niveau de boîtes E, de séquences consensus CANNTG [10]. Les structures de dimérisation HLH et LZ permettent l'établissement de liaisons spécifiques entre les membres d'une même famille, même si le domaine LZ participe également à la stabilisation du complexe ADN-protéines. L'établissement de la structure cristallographique des complexes b-HLH-LZ/ADN a permis de mettre en évidence les interactions spécifiques établies entre acides aminés et ADN, nécessaires au maintien du complexe transcriptionnel. Les protéines USF-1 et -2 interagissent principalement entre elles, conduisant à la formation d'homo- ou d'hétérodimères [11].

Article reçu le 8 juillet 2005, accepté le 9 septembre 2005.

Propriétés de liaison à l'ADN

La séquence palindromique des boîtes ϵ (CANNTG) constitue le site de liaison spécifique des facteurs de transcription de type b-HLH et b-HLH-LZ. La petite taille du motif (six nucléotides) explique leur grande fréquence à travers le génome. Cependant, seul un nombre limité de motifs ϵ constitue de véritables éléments régulateurs de l'expression des gènes. En effet, la spécificité

de reconnaissance et d'interaction des boîtes ϵ avec les dimères protéiques est dépendante de la nature des deux nucléotides centraux qui sont généralement GC ou CG. Ainsi, le facteur de transcription USF-1 se lie au motif CACGTG avec une meilleure affinité qu'à la séquence CATGTG qui correspond au motif de liaison du facteur de transcription Mitf. De même, la variation du nombre de nucléotides entre les deux héli-sites CA et TG abolit les interactions protéines/ADN. Les nucléotides de part et d'autre de la séquence consensus, CANNTG, affectent également la fixation des facteurs de transcription. Ainsi, la présence d'un résidu thymidine en 5' du motif ϵ est indispensable à la liaison spécifique du facteur de transcription Mitf, alors que ce même résidu empêche la liaison au motif ϵ du facteur de transcription Myc. Une analyse *in silico* de la composition nucléotidique des boîtes ϵ des promoteurs de gènes régulés par USF-1, avec, entre autres, le promoteur majeur tardif de l'adénovirus, celui de l'hème oxygénase, de la métallothionéine, du gène *APC*, de l'ADN topo-isomérase III α et de la désoxycytidine kinase, met en évidence la présence constante de résidus AC en position 3' de la boîte ϵ . Cette observation suggère que le facteur de transcription USF-1 reconnaît spécifiquement les sites CACGTGAC. Enfin, l'affinité de la liaison du facteur de transcription USF-1 au motif ϵ peut varier en présence de SNP (*single nucleotide polymorphism*) affectant le motif ϵ [12] ou par méthylation de l'îlot CpG central à la boîte ϵ [13], modulant ainsi l'activation transcriptionnelle de gènes cibles.

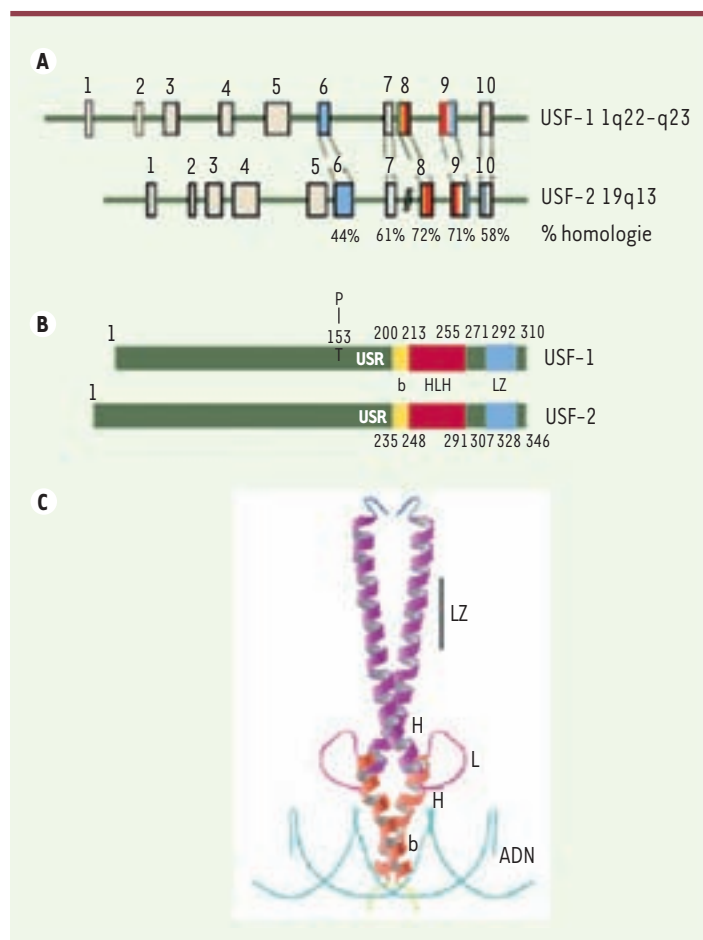


Figure 1. Structure des gènes et protéines des facteurs de transcription USF (upstream stimulating factor). **A.** Les gènes codant pour les facteurs USF-1 (1q22-q23) et USF-2 (19q13) sont composés de 10 exons répartis sur 4 et 10 kb respectivement, et présentent une bonne homologie de séquence, particulièrement dans la région carboxyterminale. **B.** USF-1 et USF-2 appartiennent à la famille conservée des facteurs de transcription de type b-HLH-LZ. Le domaine basique b (jaune) intervient dans la liaison à l'ADN alors que les domaines hélice-boucle-hélice HLH (rouge) et *leucine zipper* LZ (bleu) interviennent dans la dimérisation. La présence de l'USR (*USF specific region*) en amont de la région basique est nécessaire à l'activité transcriptionnelle. Pour être actif, USF-1 est phosphorylé par la kinase p38 sur la thréonine 153. **C.** Structure cristallographique des complexes b-HLH-LZ/ADN. Les protéines USF-1 et -2 interagissent entre elles formant des homo- ou des hétérodimères. LZ : *leucine zipper* ; bHLH : *basic helix-loop-helix*.

Régulateurs majeurs de la machinerie de transcription

L'épissage différentiel des transcrits *USF-1* et *-2* engendre différentes formes de protéines à activité transcriptionnelle distincte (présence ou non de domaine de transactivation). L'activité transcriptionnelle des dimères USF varie selon la nature du dimère formé qui est dépendante de la quantité d'isoformes USF présente au sein de chaque cellule [14] et des modifications post-traductionnelles propres à chaque isoforme. Ainsi, les variations protéiques quantitatives et qualitatives au sein de chaque tissu, induisent vraisemblablement une régulation distincte de l'expression des gènes dépendants de USF. La famille de protéines USF participe ainsi à différents niveaux de la régulation transcriptionnelle avec, premièrement, la reconnaissance et la liaison aux motifs ϵ spécifiques présents au niveau des séquences de régulation de gènes cibles. Deuxièmement, les interactions protéines-protéines coopératives, impliquant les protéines

USF-1 et des facteurs de transcription ubiquitaires ou spécifiques de tissu avec, respectivement, les facteurs SP1 [15], PEA3 [16] ou MTF1 [17], permettent de moduler la régulation transcriptionnelle de gènes cibles. Troisièmement, le facteur de transcription USF-1 interagit directement avec le facteur TFIIID (*transcription factor II*) et certains TAF (*TATA binding protein-associated factor*) [18] présents dans le complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription de gènes «TATA-plus». De même, dans les cas de promoteur de type «TATA-less», USF-1 est capable d'interagir avec le facteur TFII-1 impliqué dans la reconnaissance de la séquence initiatrice (Inr) ou directement avec la séquence Inr. Par ailleurs, les données structurales et biochimiques suggèrent que le facteur USF-1 existe sous forme de tétramère permettant la liaison simultanée de deux sites distincts. Finalement, les protéines USF-1 sont capables de recruter des enzymes (CAF et SET7/9) impliquées dans l'acétylation et la méthylation de certaines histones [19] à l'origine d'un remodelage de la chromatine, favorisant l'ouverture et l'accès de la machinerie de transcription. De même, la liaison des facteurs USF aux boîtes E du gène de la topo-isomérase III (*hTOP3α*) permet la régulation de son expression qui entraîne des changements topologiques de l'ADN. Les modifications des «supertours» de la structure favorisent ainsi l'accès des zones de régulation de la transcription par les facteurs de la machinerie de transcription, en permettant le déroulement de la double hélice.

Les facteurs USF sont donc largement impliqués dans la machinerie transcriptionnelle, en accord avec une expression ubiquitaire et une large distribution des motifs spécifiques de reconnaissance à travers le génome. Le rôle essentiel des protéines USF est d'ailleurs mis en évidence par le phénotype létal des souris double *knock-out USF-1* et *USF-2* [20]. L'activité transcriptionnelle des facteurs USF ne se limite toutefois pas aux gènes du développement embryonnaire ; ils ont été également impliqués dans l'activation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes intervenant dans une large variété de fonctions et systèmes dont certains seront décrits dans cet article.

USF-1 dans les mélanocytes et la pigmentation UV-dépendante

Les cellules de la peau constituent la première barrière de protection de l'organisme contre les agressions physiques, chimiques ou biologiques de l'environnement. Parmi elles, les rayonnements ultraviolets constituent

le plus important de ces dangers, à l'origine de pathologies cutanées. La pigmentation permet la protection de la peau contre les rayonnements UV, la photo-carcérogénèse cutanée et le *photo-aging*. L'accumulation des pigments constitue une barrière vis-à-vis des effets néfastes provoqués par le soleil (dommages de l'ADN à type de dimères de cyclobutane pyrimidine et 6-4 pyrimidine pyrimidone, mais aussi d'anomalies des protéines). L'acquisition d'un

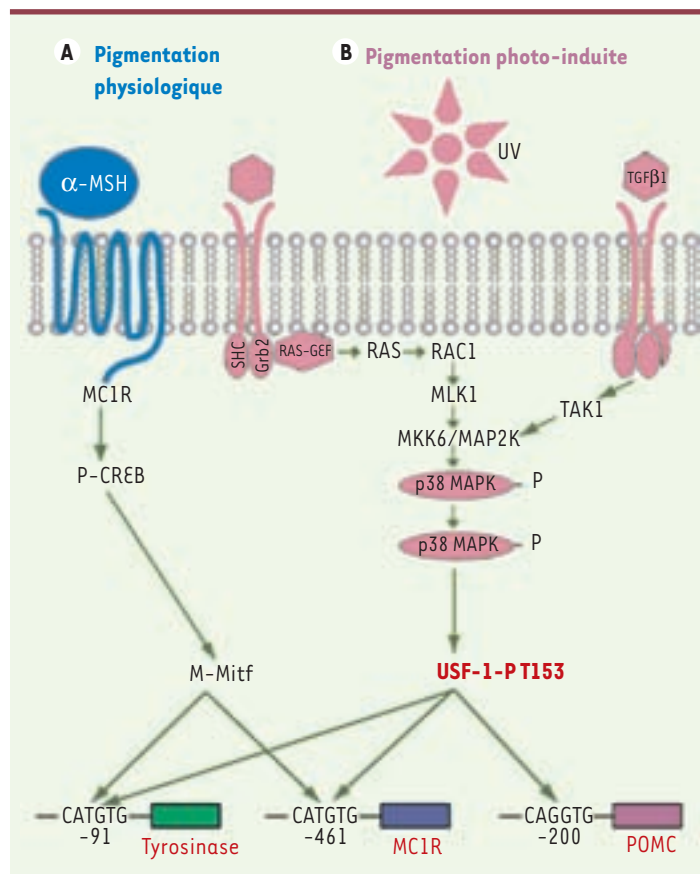


Figure 2. Régulation de la pigmentation photo-induite par USF-1. A. La pigmentation constitutive de la peau fait intervenir la voie AMPc activée par la fixation de l'α-MSH (*α-melanocyte stimulating hormone*) à son récepteur MC1R (*melanocortin 1 receptor*), et relayée par le facteur de transcription Mitf (*microphthalmia-associated transcription factor*). B. Le facteur USF-1 est, quant à lui, impliqué dans la réponse pigmentaire induite par les UV. À la suite d'une stimulation par les rayonnements solaires, la phosphorylation d'USF-1 par la kinase p38 est activée, permettant l'induction de l'expression des gènes de la pigmentation (*TYR*, *pro-opiomélanocortine* ou *POMC*, *MC1R*) par USF-1 après fixation aux boîtes E (CANNTG). TGFβ1 : *transforming growth factor β1* ; SHC : *Src homology 2 domain containing* ; Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein 2* ; RAS-GEF : protéines Ras-GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) ; RAC1 : *RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1* ; MLK1 : *mixed lineage kinase 1* ; TAK1 : *TGF-β-activated kinase 1* ; MKK6/MAP2K : *MAP kinase kinase 2* ; p38 MAPK : *p38 mitogen-activated protein kinase* ; P-CREB : *phosphorylated cAMP-responsive element-binding protein*.

phénotype pigmenté repose sur la coopération entre deux types cellulaires, les kératinocytes et les mélanocytes. Ces derniers sont des cellules dendritiques où siège la synthèse de la mélanine. Ils reposent sur la membrane basale de l'épiderme et interagissent avec les kératinocytes adjacents. Le mélanocyte, isolé au sein d'une population de kératinocytes (environ un pour quarante), intègre les signaux émis par les kératinocytes et permet une protection efficace grâce à la synthèse du pigment photoprotecteur, la mélanine. Cette synthèse se déroule dans les mélanosomes, qui sont des organites spécifiques transférés vers les kératinocytes environnants, permettant ainsi une protection globale de la peau. La production de mélanine est le résultat d'un réseau complexe impliquant des facteurs paracrines sécrétés par les kératinocytes (*α -melanocyte specific hormone*) ou *α -MSH* codée par le gène de la pro-opiomélanocortine ou *POMC*, endothéline et FGF-2) et leurs récepteurs spécifiques (respectivement, *MC1R* [*melanocortin 1 receptor*], *EDNRB* [*endothelin receptor type B*] et récepteur tyrosine kinase). Ce réseau implique également plusieurs facteurs de transcription (Mitf, USF-1) ainsi que des gènes impliqués directement dans la synthèse du pigment (*tyrosinase*, *TRP-1* et *Dct*) [21]. Alors que le facteur de transcription Mitf intervient dans la pigmentation constitutive [22], le facteur de transcription USF-1, phosphorylé par la kinase p38 en réponse au stress UV, est impliqué dans la réponse pigmentaire [23, 24]. Le facteur de transcription USF-1 augmente l'expression des gènes de la pigmentation *POMC*, *MC1R*, *tyrosinase* (Figure 2), en réponse à une stimulation par les UV [23, 24]. Ainsi, les cellules MEL *USF1*^{-/-} établies à partir de souris *knock-out* *USF-1* ne répondent plus aux stimulations UV. Enfin, différentes boucles d'amplification, faisant intervenir la kinase p38 et le facteur de transcription USF-1, permettent d'augmenter le processus de pigmentation pour une protection efficace de la peau (Figure 2).

USF-1 et la réponse immunitaire

L'implication du facteur USF-1 comme élément de réponse aux stress permet de mieux comprendre son rôle dans la réponse immunitaire. En effet, de nombreux gènes exprimés en réponse à une infection virale ou bactérienne sont régulés par la protéine USF-1. Ainsi, USF-1 participe à la régulation transcriptionnelle de gènes de la réponse humorale et cellulaire (Figure 3). Les boîtes E sont des éléments régulateurs essentiels des promoteurs des chaînes d'immunoglobulines [25] et USF-1 a été impliqué dans la régulation de la transcription du gène codant la chaîne légère $\lambda 2$ [26]. De plus, au cours de la réponse immunitaire précoce, la formation de pentamère d'IgM dépend de la synthèse simultanée des chaînes J des immunoglobulines qui permettent l'assemblage des monomères. Ensuite, leur transport à travers l'épithélium muqueux et glandulaire est assuré par le récepteur polymérique des immunoglobulines (pIgR) [27]. L'expression concomitante des gènes codant l'IgJ et le

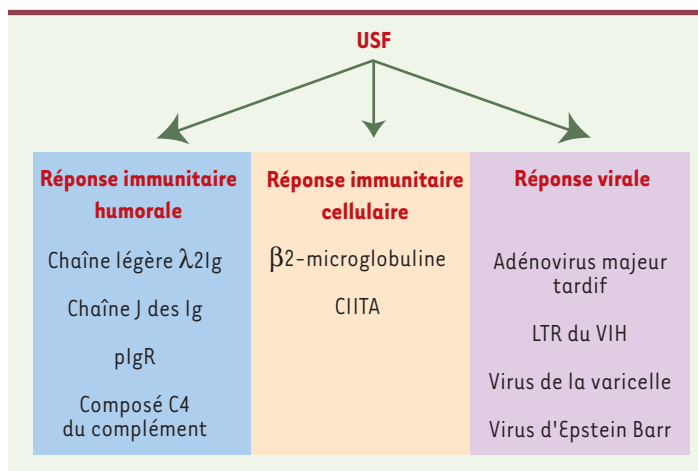


Figure 3. Régulation de la réponse immunitaire par USF. Les facteurs de transcription USF permettent la régulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire en régulant l'expression de différents gènes. Par ailleurs, les virus détournent ces facteurs à leur profit pour la transcription de leur génome. pIgR : récepteur polymérique des immunoglobulines ; CIITA : *class II transactivator*.

récepteur pIgR est essentielle pour une défense efficace et est en partie sous le contrôle du facteur USF-1. Enfin, l'élimination des antigènes pathogènes par cytolysse ou phagocytose est obtenue après reconnaissance et liaison spécifique des immunoglobulines. Le facteur USF-1 participe à cette phase de la réponse immunitaire en régulant l'expression d'un gène du système du complément, le C4 [7] et le gène de la $\beta 2$ -microglobuline [28], qui code la glycoprotéine impliquée dans la présentation de l'antigène, en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. USF-1 active également la transcription du gène *CIITA* [29] qui est un intermédiaire obligatoire de l'induction des gènes de CMH de classe II par l'interféron dans la réponse cellulaire. Par ailleurs, une dégradation spécifique d'USF-1 a été décrite en présence du pathogène intracellulaire *Chlamydia*, abolissant la reconnaissance par les lymphocytes T. Un détournement de la protéine USF-1 au profit de la machinerie transcriptionnelle virale a également été observé avec différents virus dont l'adénovirus majeur tardif, le LTR du VIH, le virus de la varicelle et le virus d'Épstein-Barr [30]. Le rôle des protéines USF est donc double, participant à la réponse immunitaire et à la prolifération virale.

USF et le contrôle de la prolifération cellulaire

La progression du cycle cellulaire est régulée de manière précise par les complexes cyclines-Cdk (*cyclin-dependent-kinase*) pour assurer le transfert de l'intégrité de l'information génétique des cellules

mères aux cellules filles [31]. Ainsi, la régulation de la transition G1/S est sous le contrôle des cyclines D et E, en combinaison avec les Cdk2, 4 et 6, alors que la transition G2/M est dépendante des cyclines A et B en combinaison avec la Cdk1 (Cdc2). Le facteur de transcription USF-1 est un régulateur de l'expression des gènes codant pour la cycline B1 et Cdk1, favorisant ainsi la transition G2/M [32, 33], et USF-2 régule l'expression du gène *Cdk4* (Figure 4). Par ailleurs, la phosphorylation de la protéine recombinante USF-1, en présence des complexes cyclineA2-cdk1 et cyclineB1-cdk1, augmente son affinité pour le motif E et stimule l'activité transcriptionnelle, ce qui suggère la présence d'une boucle d'amplification favorisant la transition G2/M. Le rôle des protéines USF dans la prolifération cellulaire ne se limite pas aux gènes du cycle cellulaire proprement dits. En effet, USF-1 permet de réguler l'expression du gène *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*) impliqué dans le maintien de l'intégrité des extrémités télomériques [34]. Dans les cellules différenciées où le gène *hTERT* n'est plus exprimé, la taille des télomères est directement liée au nombre de divisions cellulaires, et donc à la durée de vie de la cellule, à l'inverse des cellules souches totipotentes qui possèdent une activité télomérase. De même, 85 % des cellules cancéreuses se caractérisent par la réactivation de l'expression du gène *hTERT*. Dans les cellules cancéreuses, USF-1 participerait au maintien de l'expression du gène *hTERT* sans pour autant être impliqué dans sa réactivation. Bien que USF-1 participe à la prolifération illimitée dans les cellules cancéreuses étudiées, son rôle dans

la pathologie cancéreuse est controversé. En effet, une perte d'activité transcriptionnelle de la protéine USF-1 a été observée dans trois lignées de carcinomes mammaires sur six étudiées. Cette modification d'activité, qui est de spécificité cellulaire, semble être dépendante de la perte de cofacteurs (*voir plus haut* TFIID, TAF), essentiels pour la machinerie transcriptionnelle. De même, l'implication d'USF-1 dans la régulation de l'expression de gènes suppresseur de tumeur (*p53*, *BRCA2*, *APC*) semble en opposition avec la régulation du gène *hTERT* [35] (Figure 4). Le débat sur le rôle d'USF-1 dans le processus cancéreux reste donc ouvert.

Conclusions

Les facteurs de transcription USF, de la famille des b-HLH-LZ, participent à la régulation d'un réseau de gènes se caractérisant par la présence d'éléments de régulation spécifiques appelés boîte E (CANNTG). Les travaux récents montrent que les gènes régulés par les facteurs USF sont de plus en plus nombreux, permettant d'impliquer USF dans de nouveaux processus cellulaires. Les fonctions des facteurs USF sont dépendantes du contexte cellulaire à l'origine d'interactions protéine/protéine spécifiques, de modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles distinctes. Ces paramètres, associés aux diverses modifications des motifs E (méthylation, SNP) spécifiques de tissu ou de patient, modulent l'activité transcriptionnelle des facteurs USF. La présence de ces nombreux paramètres rend compte de la réelle complexité et diversité des processus de régulation des gènes dépendants d'USF. ♦

SUMMARY

USF as a key regulatory element of gene expression

Upstream stimulating factors, USF-1 and -2, are members of the evolutionary conserved basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper transcription factor family. The ubiquitously expressed USF-1 and -2 proteins of respectively 43 kDa and 44 kDa interact with high affinity to cognate E-box regulatory elements (CANNTG) which are particularly represented over the genome. The USF transcription factors are key regulatory elements of the transcriptional machinery mediating recruitment of chromatin remodelling enzymes, interacting with co-activators and members of the pre-initiation complex (PIC). Furthermore, transcriptional activity and DNA-binding of the USF proteins can be modulated by multiple ways including phosphorylation by distinct kinases (*p38*, protein kinase A and C, *cdk1* and *PI3Kinase*), homo or heterodimerization formation and DNA modification of the E-box binding motif (methylation, SNP). Taken together, these parameters render very complex the understanding of the USF-dependent gene expression regulation. USF transcription factors have thus been involved as key regulators of a wide number of gene regulation network including stress and immune response, cell cycle and proliferation. This review will thus focus on general aspect of the USF transcription factors and their implications in some regulatory networks. ♦

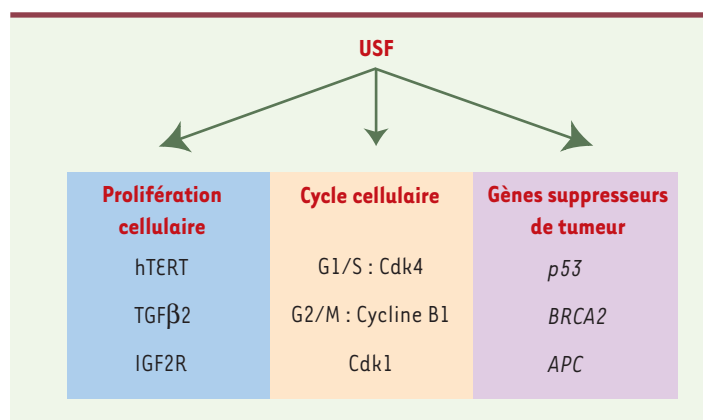


Figure 4. Régulation de la prolifération cellulaire et du cycle par USF. Les facteurs de transcription USF régulent positivement l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. USF intervient également dans les transitions G1/S et G2/M en régulant l'expression de cyclines et de Cdk. Il est également impliqué dans la régulation de gènes suppresseurs de tumeur.

RÉFÉRENCES

- Sawadogo M, Roeder RG. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 1985 ; 43 : 165-75.
- Sawadogo M. Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 11994-2001.
- Sawadogo M, Van Dyke MW, Gregor PD, Roeder RG. Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 11985-93.
- Shieh BH, Sparkes RS, Gaynor RB, Lusic AJ. Localization of the gene-encoding upstream stimulatory factor (USF) to human chromosome 1q22-q23. *Genomics* 1993 ; 16 : 266-8.
- Groenen PM, Garcia E, Debeer P, et al. Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia. *Genomics* 1996 ; 38 : 141-8.
- Lin Q, Luo X, Sawadogo M. Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 23894-903.
- Galibert MD, Boucontet L, Goding CR, Meo T. Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor. *J Immunol* 1997 ; 159 : 6176-83.
- Henrion AA, Vaulont S, Raymondjean M, Kahn A. Mouse USF1 gene cloning : comparative organization within the c-myc gene family. *Mamm Genome* 1996 ; 7 : 803-9.
- Atchley WR, Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5172-6.
- Baxevasis AD, Vinson CR. Interactions of coiled coils in transcription factors : where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev* 1993 ; 3 : 278-85.
- Sirito M, Walker S, Lin Q, et al. Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr* 1992 ; 2 : 231-40.
- Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 2898-904.
- Prendergast GC, Ziff EB. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 1991 ; 251 : 186-9.
- Viollet B, Lefrancois-Martinez AM, Henrion A, et al. Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 1405-15.
- Liu M, Whetstone JR, Payton SG, et al. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem J* 2004 ; 383 : 249-57.
- Firlej V, Bocquet B, Desbiens X, et al. Pea3 Transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 887-98.
- Andrews GK, Lee DK, Ravindra R, et al. The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *EMBO J* 2001 ; 20 : 1114-22.
- Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995 ; 267 : 531-6.
- West AG, Huang S, Gaszner M, et al. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell* 2004 ; 16 : 453-63.
- Casado M, Vallet VS, Kahn A, Vaulont S. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem* 1999 274 : 2009-13.
- Kadokaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, et al. Cutaneous photobiology. The melanocyte versus the sun : who will win the final round ? *Pigment Cell Res* 2003 ; 16 : 434-47.
- Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000 ; 13 : 60-9.
- Galibert MD, Carreira S, Goding CR. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced tyrosinase expression. *EMBO J* 2001 ; 20 : 5022-31.
- Corre S, Primot A, Sviderskaya E, et al. UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38 activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 51226-33.
- Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W. B lineage : specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors *in vivo*. *Science* 1985 ; 227 : 134-40.
- Chang LA, Smith T, Pognonec P, et al. Identification of USF as the ubiquitous murine factor that binds to and stimulates transcription from the immunoglobulin lambda 2-chain promoter. *Nucleic Acids Res* 1992 ; 20 : 287-93.
- Wallin JJ, Rinkenberger JL, Rao S, et al. B cell-specific activator protein prevents two activator factors from binding to the immunoglobulin J chain promoter until the antigen-driven stages of B cell development. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 15959-65.
- Gobin SJ, Biesta P, Van den Elsen PJ. Regulation of human beta 2-microglobulin transactivation in hematopoietic cells. *Blood* 2003 ; 101 : 3058-64.
- Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 1998 ; 8 : 157-66.
- Liu C, Sista ND, Pagano JS. Activation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase promoter by the BRLF1 immediate-early protein is mediated through USF and E2F. *J Virol* 1996 ; 70 : 2545-55.
- Hunt T. Cyclins and their partners : from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 1991 ; 2 : 213-22.
- Cogswell JP, Godlevski MM, Bonham M, et al. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol* 1995 ; 15 : 2782-90.
- North S, Espanel X, Bantignies F, et al. Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). *Oncogene* 1999 ; 18 : 1945-55.
- Goueli BS, Janknecht R. Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene* 2003 ; 22 : 8042-7.
- Reisman D, Rotter V. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res* 1993 ; 21 : 345-50.

TIRÉS À PART
M.D. Galibert



La Fondation Jérôme Lejeune, reconnue d'utilité publique, a pour objectif la recherche sur les maladies génétiques de l'intelligence (déficiences intellectuelles).
« Chercher, Soigner, Défendre »

SUBVENTIONS

La Fondation Jérôme Lejeune appelle les équipes et chercheurs intéressés à soumettre à son Conseil Scientifique des projets de recherche fondamentale ou appliquée (génétique, biologie moléculaire, neurosciences, cellules souches adultes ou du cordon, clinique, thérapeutique, comportement, etc.), destinés à conduire à la découverte de traitements améliorant les symptômes des maladies génétiques de l'intelligence, dont la trisomie 21. L'organisation de congrès est aussi subventionnée.

RENSEIGNEMENTS PRATIQUES

Formulaire à remplir « en ligne » sur www.fondationlejeune.org ou à demander à :
conseilscientific@fondationlejeune.org (à envoyer avant le 24/03/2006) :
Conseil Scientifique - Fondation Jérôme Lejeune
48, rue Galande - 75005 PARIS - France
Tel : +33 1 53 10 08 30 - Fax : +33 1 53 10 85 98

3> Etude de la régulation UV-dépendante de l'expression des gènes *POMC* et *MC1R*

3.1> Généralités

La réponse pigmentaire est un processus essentiel pour la mise en place d'une photoprotection cutanée. La connaissance des mécanismes moléculaires en cause est une étape incontournable pour identifier les facteurs de risques génétiques dans le développement de mélanomes photoinduits. Toutefois, les bases moléculaires de la réponse pigmentaire sont peu documentées et se limitent à la mise en évidence par Northern blot ou par PCR semiquantitative d'une régulation de l'expression des gènes de la pigmentation en réponse à une stimulation par les UV (Chakraborty, Slominski et al. 1995; Chakraborty, Funasaka et al. 1996; Wintzen, Yaar et al. 1996; Funasaka, Chakraborty et al. 1998; Chakraborty, Funasaka et al. 1999; Scott, Suzuki et al. 2002). L'implication de la forme phosphorylée du facteur de transcription USF-1 (T153) dans la régulation UV-dépendante du gène *TYR* (Galibert, Carreira et al. 2001), nous a conduit à envisager un mode de régulation comparable pour les gènes *POMC* et *MC1R*, du fait de la présence au niveau de leur promoteur respectif de motifs E conservés entre les espèces (homme, souris, rat).

Des expériences de PCR en temps réel ont permis de quantifier les niveaux d'expression des gènes *POMC* et *MC1R* en réponse à une stimulation UVB physiologique dans différents types cellulaires (kératinocyte, mélanocyte). L'utilisation de l'inhibiteur spécifique de la kinase p38 (SB203580) a abouti à l'implication de la voie de signalisation dans la régulation de l'expression des gènes *POMC* et *MC1R*. Des expériences de retard sur gel et d'immunoprécipitation de chromatine ont permis de rendre compte de la liaison du facteur USF-1 aux motifs E des promoteurs. Enfin, l'utilisation d'un modèle génétique de cellules KO pour le gène *USF1* (mel-usf1 -/-) et de luciférase essais ont permis d'établir le rôle direct du facteur de transcription USF-1 ainsi que les motifs E requis, pour la régulation de l'expression UV-dépendante des gènes *POMC* et *MC1R*.

L'ensemble des résultats ont conduit à l'établissement d'un modèle de réponse pigmentaire faisant intervenir au minimum deux voies, une voie dépendante d'USF-1 ([Figure 23](#)) et de son activation par la kinase de réponse au stress p38 impliquant diverses boucles d'amplification, et une voie indépendante médiée par les facteurs paracrines (EDN1, FGF2) (Gilchrest, Park et al. 1996).

3.2> Copie du 3^{ème} article

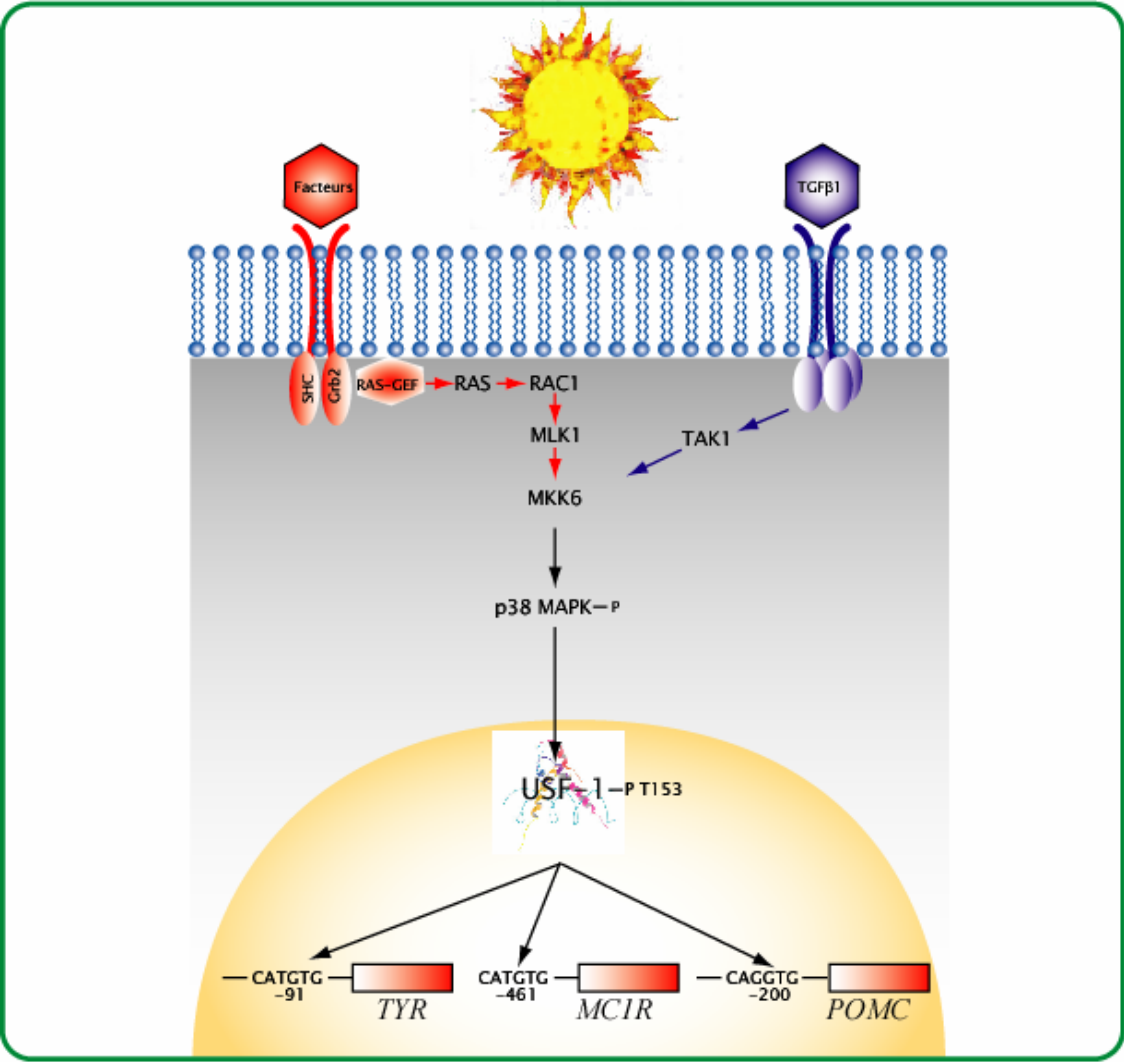


Figure 23: Pigmentation photo-induite par USF-1

UV-induced Expression of Key Component of the Tanning Process, the POMC and *MC1R* Genes, Is Dependent on the p-38-activated Upstream Stimulating Factor-1 (USF-1)*

Received for publication, August 25, 2004

Published, JBC Papers in Press, September 9, 2004, DOI 10.1074/jbc.M409768200

Sébastien Corre‡, Aline Primot‡, Elena Sviderskaya§, Dorothy C. Bennett§, Sophie Vaultont¶, Colin R. Goding¶, and Marie-Dominique Galibert‡**

From the ‡CNRS UMR 6061 Laboratoire de Génétique et Développement, Faculté de Médecine, Université de Rennes-1, 2 Avenue du Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France, §St. Georges Hospital Medical School, Department of Basic Medical Sciences, London SW17 0RE, United Kingdom, the ¶Département de Génétique, Développement et Pathologie Moléculaire, Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, 75014 Paris, France, and the ¶Eukaryotic Transcription Laboratory, Marie Curie Research Institute, The Chart, Oxted, Surrey RH8 0TL, United Kingdom

Protection against UV-mediated DNA damage and the onset of oncogenesis is afforded by the tanning response in which UV irradiation triggers melanocytes to increase production of melanin that is then transferred to keratinocytes. A key component of the tanning process is the UV-mediated induction of the pro-opiomelanocortin (POMC) and *MC1R* genes encoding the α -melanocyte-stimulating hormone and its receptor, respectively, which play a crucial role in pigmentation by regulating the intracellular levels of cAMP. How these genes are regulated in response to UV irradiation is not known. Here we have shown that UV-induced activation of the POMC and *MC1R* promoters is mediated by p38 stress-activated kinase signaling to the transcription factor, upstream stimulating factor-1 (USF-1). Importantly, melanocytes derived from USF-1 $-/-$ mice exhibit a defective UV response and fail to activate POMC and *MC1R* expression in response to UV irradiation. The results define USF-1 as a critical UV-responsive activator of genes implicated in protection from solar radiation.

Solar ultraviolet (UV)¹ radiation (1) is a major environmental hazard that can generate reactive oxygen species, inducing DNA damage and protein oxidation (2) that subsequently lead to skin inflammation, photo-aging, and skin cancer. The incidence of melanoma, the most dangerous form of skin cancer, is increasing at an alarming rate, with metastatic melanoma being notoriously refractive to treatment.

Protection against UV-mediated DNA damage is afforded by the tanning response in which UV irradiation triggers melanocyte production of melanin. Melanin synthesis takes place in specific organelles, the melanosomes, which are transferred to keratinocytes (3), the neighboring cells generating a protective

skin screen. Two key upstream components of the melanin cascade process are the POMC and *MC1R* genes (4) encoding the α -melanocyte-specific hormone (α -MSH) after cleavage of the POMC (5–8) and its heterotrimeric G-protein receptor, respectively. The *MC1R* gene is conserved among species and displays a large number of different alleles (9, 10). Among them, human genetic variants contribute to the existence of the six different phototypes (I–VI), ranging from white skin and red hair to dark skin and black hair (11–13), that are associated with a different incidence of skin cancer (14, 15). Binding of α -MSH to *MC1R* regulates the intracellular level of cAMP (16, 17), which is involved in microphthalmia gene expression (18). The microphthalmia-associated basic helix-loop-helix-leucine zipper (b-HLH-LZ) transcription factor (19, 20) is required for the expression of the Tyrosinase (21), *TRP-1* (tyrosine-related protein), and *Dct* (dopachrome tautomerase) genes (17) that encode enzymes implicated in the manufacture of the pigment melanin. Tyrosinase encodes the rate-limiting enzyme for the production of melanin and is absolutely necessary for pigmentation and solar protection.

POMC and *MC1R* gene expression are UV-inducible (5, 22). However, no molecular mechanism has yet been proposed to explain how UV irradiation might activate their expression. The cellular response to stress-inducing agents such as UV irradiation is known to be mediated by the activation of specific kinase cascades, the stress-activated protein kinase families, which include the c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 signaling pathways. The microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) and the upstream stimulating factor-1 (USF-1) (23, 24) are members of the evolutionary conserved family of b-HLH-LZ; significantly, both are downstream targets of the p38 stress-activated kinase (25–27). Although Mitf is restricted to the melanocyte lineage, USF-1 is expressed ubiquitously (28), yet both factors can bind the same specific E-box motifs (CANNTG) (20).

Specific interaction between E-box regulatory elements and b-HLH-LZ transcription factors is conferred by the composition of the residues within and outside the core E-box motif. However, a defined E-box motif can be the target site for different transcription factors depending on their relative amount and affinities. *In silico* analysis of the POMC and *MC1R* promoters revealed that both proximal promoters displayed several E-box motifs (29–31) with only a small number conserved in humans, mouse, and rat species that could potentially interact with the Mitf and USF-1 transcription factors to mediate the response of POMC and *MC1R* to UV irradiation.

* This work was supported by Marie Curie Cancer Care, the Ligue National contre le Cancer, and the Association pour la Recherche contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

** To whom correspondence should be addressed. Tel.: 0033-223-234-705; Fax: 0033-223-234-607; E-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr.

¹ The abbreviations used are: UV, ultraviolet; MSH, melanocyte-specific hormone; b-HLH-LZ, basic helix-loop-helix-leucine zipper; DCT, dopachrome tautomerase; Mitf, microphthalmia-associated transcription factor; USF-1, upstream stimulating factor-1; WT, wild-type; POMC, pro-opiomelanocortin; Ab, antibody.

We have shown here that the p38-activated USF-1 transcription factor is responsible for UV-induced POMC and *MC1R* gene expression and that only a restricted set of E-box motifs within the POMC and *MC1R* proximal promoters mediates the UV response. Using a genetic approach, we defined USF-1 as a key UV-responsive activator of genes implicated in protection from solar radiation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Tissue Culture—Melan-a and melan-*usf1* mouse melanocytes and 501 mel human melanoma cell lines were maintained in RPMI 1640 medium (catalogue number 21875-034; Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Invitrogen) in a controlled atmosphere (10% CO₂). For melanocytes the medium was supplemented with 200 nM tetradecanoyl phorbol-13-acetate, (TPA; Sigma). XB2 keratinocytes were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (catalogue number 41966-029; Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin antibiotics in a controlled atmosphere (5% CO₂).

Immortalized USF-1 $-/-$ mouse melanocytes (melan-*usf1*) were derived from USF-1 knockout mice and were grown as previously described (32), except in RPMI 1640 medium. Mitomycin C-treated XB2 feeder cells were used in establishment and thawing out of frozen stocks of this cell line.

UVB Irradiation—Cells were irradiated using a UV Stratalinker apparatus (Stratagene); physiological UVB irradiation was 312 nm, 50–80 mJ/cm², *i.e.* about 1 minimal erythral dose. Cells were plated at 50–70% confluence, depending on their doubling time, in 10- and 3.5-cm diameter Petri dishes for RNA and protein preparation, respectively, such that they reached 80% confluence 48 h later (*i.e.* on UVB induction day). The medium was completely removed following overnight serum starvation and replaced immediately after UVB stimulation. When required, cells were pretreated with p38-specific family kinase inhibitor (10 μ M SB203580) or with mitogen-activated protein kinase inhibitors (10 μ M U0126 or PD98059) for 30 min prior to UVB irradiation. Monolayer cells were washed twice with phosphate-buffered saline, harvested by scraping, and then centrifuged at a low speed 3, 5, 8, 24 h following UVB treatment. Cell pellets were resuspended in either 300 μ l of RNA-plus (Q-BIO-gene) solution for immediate mRNA extraction and storage at -80° C until use or resuspended in Laemmli buffer for Western blotting analysis.

RNA Extraction and cDNA Synthesis—RNA was extracted by using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Cells were treated with RQ DNase (Promega) within the column to ensure the absence of genomic DNA. Reverse transcription reactions were done with the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, using 1 μ g of total RNA.

Gene Expression Analysis—Real-time PCR was done in sealed 96-well microtiter plates using the SYBR GreenTM PCR Master Mix (Applied Biosystems). Gene expression was analyzed by using the ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems), and results were evaluated with the associated software (version 1.0; Applied Biosystems). The 18 S ribosomal RNA subunit, the values of which remain constant over 24 h, was used as an internal positive control. The relative amounts of POMC, *MC1R*, *EDN1*, *TYR*, and *USF-1* transcripts were determined using the cycle threshold method as described by the manufacturer. The mRNA levels at each time point following UVB irradiation are expressed as -fold increase compared with non-irradiated control cells. Each experiment was performed at least twice, and each time point was done in duplicate.

Forward (F) and reverse (R) primers were designed using the Primer Express software (version 2.0-PE; Applied Biosystems). The mouse (m) and human (h) primers used for real-time PCR were, respectively, as follows for the POMC, *MC1R*, *END1*, *USF-1*, *TYR*, and *18S* genes. mPomc-F, 5'-ggtgaaggtgtacccaacct-3'; mPomc-R, 5'-gacttgctcaagcctaattgg-3'; mMcl1r-F, 5'-ctctgctctgctcaactttcttttca-3'; mMcl1r-R, 5'-tcgtgaactgtgggcataca-3'; mEdn1-F, 5'-ccatgctgctgggatctt-3'; mEdn1-R, 5'-cctctgcccgtctggaacaa-3'; mUSF-1-F, 5'-accctattcccgaagtcaga-3'; mUSF-1-R, 5'-cgctgctcaactctgttatgt-3'; mTyr-F, 5'-tcctctgtcctgacacat-3'; mTyr-R, 5'-cacagaggccaggactca-3'; m18S-F, 5'-aggttctggccaagcttag-3'; m18S-R, 5'-ccctctatggctcgaatttt-3'; hPomc-F, 5'-aagcgtacggcgggttc-3'; hPomc-R, 5'-tctgttagcttctctgatgatg-3'; hMC1R-F, 5'-tggaactgctgactgactgac-3'; hMC1R-R, 5'-tggtgagcagtgctgagaa-3'; h18S-F, 5'-cctgacaatgtgctggacaa-3'; h18S-R, 5'-tctatggcccgaatcttct-3'.

Western Blotting Analysis—Whole cell lysates were resolved by 10% SDS-PAGE using a 200:1 acrylamide: bis-acrylamide ratio. Following blotting, membranes were probed with appropriate primary antibodies

and positive signals detected using peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies. Bound antibodies were visualized by using the ECL Super Signal detection kit (Pierce). The primary antibodies used were a polyclonal anti-USF-1 Ab (USF-C20; Santa Cruz Biotechnology), a polyclonal anti-phospho-p38 Ab (Cell Signaling Technology; Biolabs Inc.), and a monoclonal anti-tubulin antibody (Sigma).

Immunolocalization—Immunolocalization experiments were performed as described previously (33), using anti-tyrosinase, Tyrp1, and Dct antibodies (kindly provided by V. Hearing, National Institutes of Health) and nonspecific antibody for negative control. Mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vectashield®; Vector Laboratories) was used for nuclear localization.

Melanin Content—The melanin content of each cell line was determined by spectrophotometry. Briefly, melanocyte cells were harvested, washed twice with phosphate-buffered saline, and counted. Melanin was solubilized in 0.2 M NaOH (10⁶ cells/ml). Melanin concentration was determined by measuring absorbance at 475 nm and comparing with a standard curve of known synthetic melanin concentrations (Sigma). Melanin content is expressed in μ g/10⁶ cells.

Transient Transfection Assays—For *in vivo* gene expression analysis, cells were plated in supplemented medium in 10-cm diameter Petri dishes and allowed to grow overnight to 80% confluence. Following medium removal, cells were transfected for 1 h using the specific transfection medium OptiMEM (catalogue number 51985-026; Invitrogen) containing up to 5 μ g of total plasmid DNA, including 4 μ g of USF-1 constructs (WT pCMV-USF-1 or T153E and T153A mutants), 500 ng each of p38 and MKK6(b)E expression vector (pCDNA p38; pCDNA MKK6(b)E), or empty vector mixed with the TransfasiTM reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions. After transfection, OptiMEM was removed and replaced with fresh medium. 24 h post-transfection, cells were washed twice with phosphate-buffered saline, harvested, and subjected to RNA extraction as previously described. The RNA was subjected to POMC and *MC1R* gene expression analysis using real-time PCR.

For luciferase reporter analysis, cells were plated in 12-well plates and transfected as described above using up to 1 μ g of plasmid DNA. 48 h post-transfection, harvested cells were passively lysed using Promega's buffer. Cell lysates (100 μ l/well) were screened for luciferase activity using the dual-luciferase reporter system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activities were quantified using a luminometer apparatus (Turner Design).

POMC and *MC1R* promoters were isolated by PCR, cut with BamHI and EcoRI, and cloned into the luciferase reporter pGL3-Basic plasmid (Promega). The POMC and *MC1R* E-boxes were mutated with the GeneTailorTM mutagenesis system (Invitrogen) using five specific oligonucleotides (sequences available on request).

The pCMV-USF-1 WT and point-mutated constructs have been described previously (27). The p38 expression vector and MKK6(b)E were provided by Dr. Jiahua Han and have been described previously (34).

DNA Binding Assays

Gel Shift Assay—Gel electrophoresis DNA binding assays with crude 501 mel nuclear extracts (4 μ g) were performed as previously described (35) along with Klenow-labeled probes (0.5 ng). For supershift experiments, the DNA binding reactions were incubated for a further 45 min on ice with a polyclonal anti-USF-1 antibody (200 ng; Santa Cruz Biotechnology) or with nonspecific IgG (anti-rabbit Ab; Amersham Biosciences). The products were loaded onto an 8% polyacrylamide gel (29:1 acrylamide:bis-acrylamide ratio) and subjected to electrophoresis at 200 V for 1 h. The sequences of the double-stranded oligonucleotides used as probes and competitors were as follows: hMC1R-E-box (-461)-F, 5'-agagcggccatgtggccgcctct-3'; hMC1R-E-box (-461)-R, 5'-agacagggcggccacatgcccggggcgt-3'; hPOMC-E-box (-200)-F, 5'-agagcggcggccaggtgcccctctggt-3'; hPOMC-E-box (-200)-R, 5'-agaccgaaggccacactggccctgctct-3'; hTYR-E-box (-183)-F, 5'-agaaaagtcagtcattgctttcagat-3'; hTYR-E-box (-183)-R, 5'-agatctgaaagcacatgactgactttt-3'.

Chromatin Immunoprecipitation Assays—Chromatin immunoprecipitation assays were performed in human and mouse cell lines (melan-a, 501 mel, XB2) essentially as described previously (36) using 10 μ l of specific antibody (USF-1 Ab; Santa Cruz Biotechnology) or nonspecific IgG (anti-rabbit Ab; Amersham Biosciences). The recovered DNA was subjected to PCR, ensuring that the reaction stayed in the log phase.

The primers used to amplify the promoters of the human (h) and mouse (m) *TYR*, *MC1R*, POMC, and *HSP70* genes were as follows (F: forward, R: reverse): hTYR-F, 5'-gtgggatacagccaattcga-3'; hTYR-R, 5'-cctctagctctcacaaggtctgca-3'; mTyr-F, 5'-tcagtagattcaaatgctagagat-

TABLE I
POMC, MC1R response to UVB irradiation

Cell type	Constitutive expression	UVB inducibility
XB2		
POMC	303	×2, 8 at 24 h
MC1R	1037	×3 at 8 h
Melan-a		
POMC	100	×7, 2 at 3 h
MC1R	1374	×7, 9 at 3 h
501 Mel		
POMC	19	×7, 2 at 8 h
MC1R	971	×7, 7 at 8 h

3'; mTyr-R, 5'-cagacagtaaatccaagccaagat-3'; hMC1R-F, 5'-cgcgcatgtgc-caaactctg-3'; hMC1R-R, 5'-gtcgttctcagaccctcc-3'; mMclR-F, 5'-gtttcag-acaaccaggaaagt-3'; mMclR-R, 5'-cagaccggcctctttccata-3'; hPOMC-F, 5'-gaccaacggccatcataat-3'; hPOMC-R, 5'-ggagagacgcgctggaaa-3'; mPomc-F, 5'-aagtggagattcaacaccattcttaa-3'; mPomc-R, 5'-gtccagagctgagacaccttac-3'; h,mHSP70-F, 5'-aatccagaagactctggagagt-3'; h,mHSP70-R, 5'-ggctttataagtctgcacggag-3'.

RESULTS

POMC and MC1R UV Response— α -MSH, derived from POMC, and the MC1R receptor are key upstream regulators of the pigmentation cascade (4). Although both α -MSH and the MC1R receptor genes are UV-inducible (5, 22), the molecular mechanism that mediates their UV responsiveness has yet to be defined. As a first step, we examined constitutive and UV-induced POMC and MC1R expression levels in different skin cell types implicated in the pigmentation process: mouse keratinocytes (XB2), mouse melanocytes (melan-a), and human melanoma (501 mel). Using real-time PCR, we were able to show that POMC and MC1R respond to a physiological dose of UVB irradiation (50 mJ/cm² UVB), although time courses and amplitudes differed (Table I).

p38 Kinase Pathway Mediates POMC and MC1R UV-induced Expression—UV irradiation activates stress signaling via both the c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 pathways (25, 27, 37). To identify the signaling pathway required for regulation of POMC and MC1R UVB expression, we used real-time PCR to examine the response over time of the POMC and MC1R genes to UV irradiation in 501 mel cells in the presence or absence of the specific p38 inhibitor SB203580 (34) or, as controls, inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (U0126, PD96059). 501 mel cells were used because they exhibit a robust response of these genes to UVB irradiation. The results (Fig. 1, A and B) indicate that the p38 kinase inhibitor SB203580 inhibited UV-mediated induction of both POMC and MC1R gene expression, strongly suggesting that the p38 stress-activated protein kinase is implicated in the UV responsiveness of POMC and MC1R gene expression. By contrast, neither U0126 nor PD98059 (mitogen-activated protein kinase inhibitors) had any effect (data not shown).

USF-1 Transcription Factor and POMC, MC1R UV-induced Expression—The b-HLH-LZ transcription activators Mitf and USF-1 are both expressed in melanocytes, bind the same E-box motifs *in vitro* and *in vivo* (20), and—significantly—both are phosphorylated and activated by the p38 stress-activated kinase (26, 27). Because the POMC and MC1R promoters contain E-box elements that are potentially responsive to both Mitf or USF-1 (see below), either factor could potentially mediate the response of these genes to UV irradiation. We therefore sought a genetic approach to resolve this key issue. Because Mitf-null mice lack all pigment cells (38), it was not possible to examine the UV responsiveness of Mitf ^{-/-} melanocytes. By contrast, USF-1-null mice exhibit normal levels of pigmentation (39), indicating that USF-1 is unlikely to play a major role in melanocyte development. We therefore derived a melanocyte cell

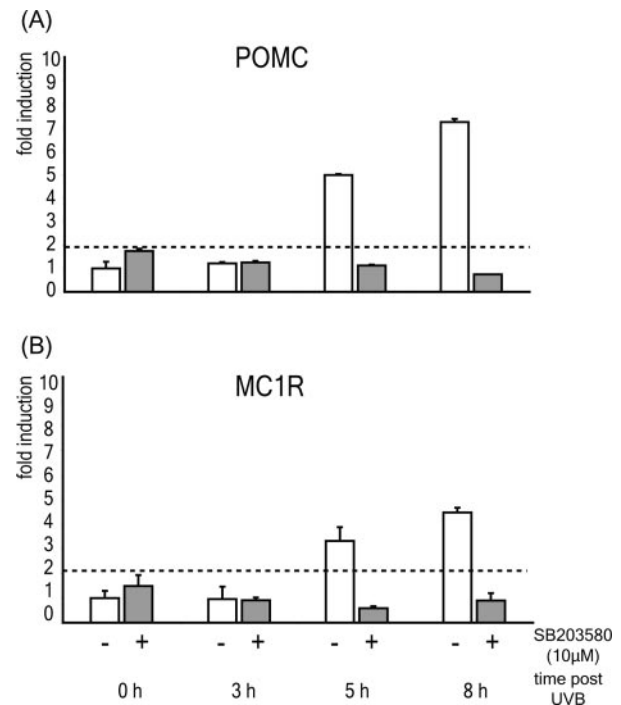


FIG. 1. The expression levels of the POMC and MC1R genes following UV irradiation are dependent on the stress-responsive p38 kinase. Quantitative PCR was performed using mRNA derived from the human melanoma cell line (501 mel) before and at the indicated times (3, 5, and 8 h) after UVB irradiation (80 mJ/cm²). POMC (A) and MC1R (B) gene expression levels peaked 5 h post-UV irradiation. Pretreatment of the 501 mel cells with 10 μ M SB203580, a highly specific inhibitor of the p38 family of kinases, 30 min prior to UVB stimulation abolished UV-induced POMC and MC1R gene expression.

line (melan-*usf1*) from newborn USF-1 knockout mice. In agreement with the genetic modification of the melan-*usf1* cell line and unlike the WT melanocyte cell line, no USF-1 transcripts were detected by quantitative real-time PCR (Fig. 2A), although we observed similar steady state expression of the POMC, MC1R, Tyrosinase, and EDN1 genes (Fig. 2A) as well as TYRP1 and DCT mRNA levels (not shown). In agreement with the lack of USF-1 mRNA, no USF-1 protein was detected by Western blotting analysis (Fig. 2B). As expected, inactivation of the USF-1 gene did not affect the p38 kinase signaling pathway, which was still activated by UV irradiation as determined by Western blotting for phosphorylated p38 (Fig. 2B) 3 h post-UV irradiation in both WT and USF-1-null melanocytes and inhibited by SB 203580 (not shown). Western blotting also confirmed that in WT cells the presence of phosphorylated p38 correlated with the appearance of a low mobility form of USF-1 that corresponds to the p38-phosphorylated USF-1. Further characterization of the USF-1-negative melanocytes (melan-*usf1*) suggested they shared most characteristics of their WT counterparts. Both cell lines are dendritic and express the melanosomal proteins (Tyrosinase, Tyrp1, and Dct) with a similar cytoplasmic distribution (Fig. 2C). Moreover, the lack of USF-1 does not affect the accumulation of a basal level of melanin (19.62 and 18.1 μ g/10⁶ cells, respectively) (Fig. 2C). The doubling time of the USF-1-null melanocytes was evaluated by time lapse analysis and appeared to be slightly longer than that of WT cells (about 24 and 20 h, respectively), although M phase was completed in about 70 min and no mitotic abnormalities could be observed in the daughter cells (not shown).

In contrast to WT melanocytes, those lacking USF-1 exhibited a dramatically altered ability to respond to UV irradiation.

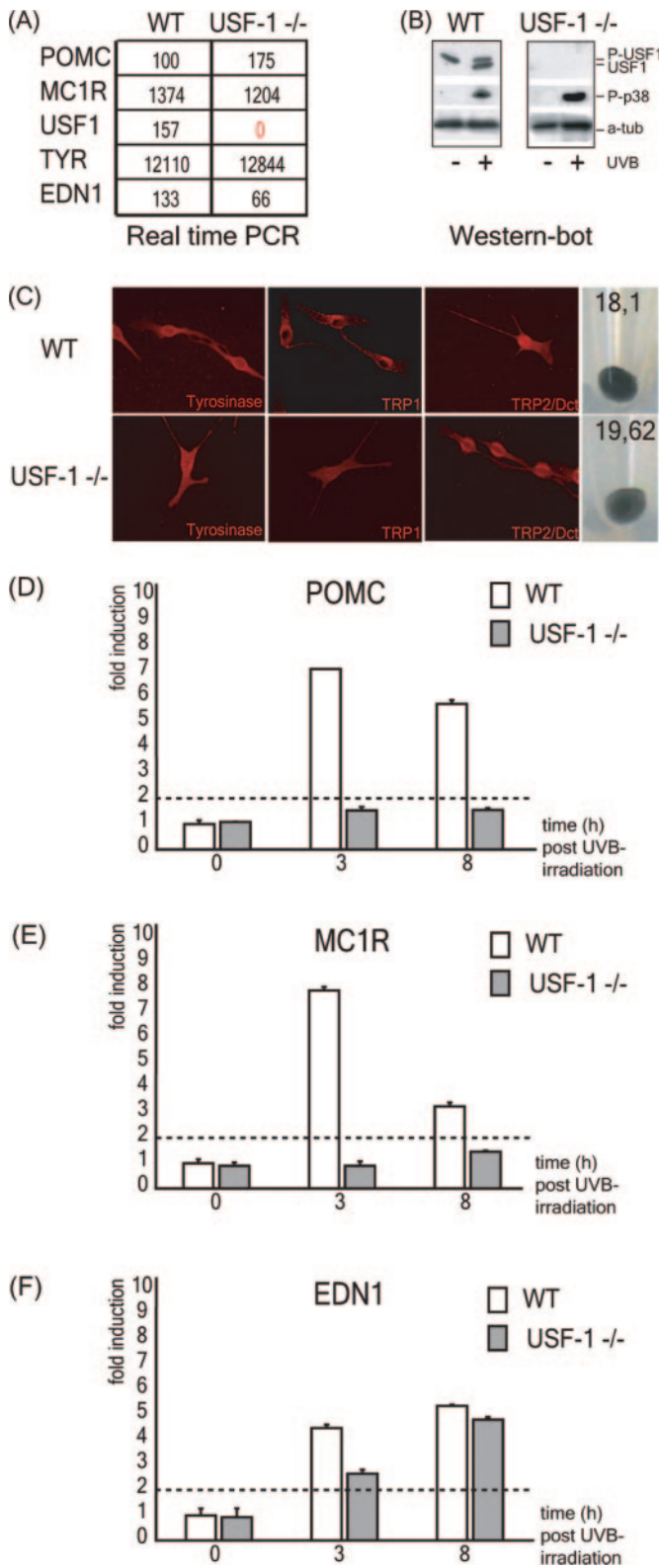


FIG. 2. Loss of UV-induced POMC and *MC1R* gene expression in the *USF-1* knockout melanocyte cell line. A, constitutive expression levels of the POMC, *MC1R*, *USF-1*, Tyrosinase (*Tyr*), and Endothelin-1 (*EDN1*) genes in melan-*usf1* (*USF-1*^{-/-}) and melan-a cell lines were determined by using real-time PCR. mRNA level is expressed in arbitrary units compared with 18 S values, using the POMC-melan-a value as an internal reference (100 units). B, Western blotting analysis using the anti-*USF-1* antibody (Santa Cruz), anti-P-p38 (Cell Signaling) of WT (melan-a), and null *USF-1* melanocytes (melan-*USF1*) following UV irradiation. Anti- β -tubulin antibody was used as a protein loading control. C, characterization and comparison of the melan-*USF1* to WT melanocytes (melan-a). The localizations of the tyrosinase,

Although the levels of both POMC and *MC1R* mRNA peaked after 3 h in the melan-a cell line (>7-fold increase), no substantial effect of UV irradiation was detected in expression of these genes in the *USF-1*-null melanocytes in the 8 h following UV exposure (Fig. 2, D and E) or at 48 h (not shown), ruling out the possibility that the kinetics of activation were severely delayed. As a positive control for the ability of UV irradiation to activate gene *USF-1*-independent expression, we chose the Endothelin-1 gene (*EDN1*) that is implicated in the pigmentation process independently of the POMC and *MC1R* genes and that has been previously shown to be up-regulated in response to UV irradiation (5, 22). Although no clear regulatory pathway has been identified for the *EDN1* UV response, *in silico* analysis failed to find any E-box element within the *EDN1* promoter with the potential to bind either Mitf or *USF-1*. Following UV irradiation, the *EDN1* gene was induced to a similar degree in both WT and *USF-1*-null melanocytes. Taken together these data strongly suggest that the *USF-1* transcription factor is implicated in the up-regulation of POMC and *MC1R* gene expression following exposure to UVB irradiation.

***USF-1*-expressing Vector Restores POMC and *MC1R* UV Response in *USF-1*-null Cells**—To confirm that the defective response of *USF-1*-null melanocytes to UV irradiation was caused by the absence of *USF-1*, we transiently transfected the *USF-1*-negative melanocyte cell line with vectors expressing either WT *USF-1* or mutant forms of *USF-1* in which the p38 phosphorylation site (Thr-153) (27) is mutated to either alanine or glutamic acid. The glutamic acid substitution acts to mimic p38 phosphorylation and renders *USF-1* largely independent of p38. Cells were then exposed to physiological doses of UVB irradiation (80 mJ/cm²). 3 h post-irradiation, endogenous POMC and *MC1R* mRNA levels were quantified by quantitative real-time PCR. The results (Fig. 3) reveal that transfection with the WT *USF-1* expression vector did not significantly induce endogenous POMC and *MC1R*. However, following UVB irradiation, a significant induction was observed (>2-fold) compared with the controls (empty vector) in which no modification occurred following UVB irradiation. Note that in these experiments the transfection efficiency was around 60%; as such, the induction of expression observed must be seen against the background originating from the untransfected cells. Transfection with the T153E mutant, mimicking the transcriptionally activated p38-phosphorylated form of *USF-1*, induced POMC and *MC1R* gene expression significantly (2.63- and 4-fold, respectively). Similar results were obtained when the WT *USF-1* expression vector was transfected in combination with the p38 α and the constitutively activated MKK6 kinase (MKK6(b)E). As expected, the T153A mutant, which cannot be phosphorylated by p38, failed to activate either gene. Because ectopic expression of *USF-1* is able to restore the activation of POMC and *MC1R* gene expression following UV irradiation of *USF-1*-null melanocytes, the data strongly suggest that *USF-1* is implicated in the UV-associated transcriptional control of both genes.

***USF-1* Interacts with POMC and *MC1R* Promoters**—*In silico* analysis revealed that within 750 bp of the transcription start site both the *MC1R* and POMC promoters displayed several

Tyrp1, and Dct proteins were determined by fluorescent microscopy following immunostaining. Tyrosinase, Tyrp1, and Dct primary antibodies were detected using a TRITC-coupled secondary antibody. Melanin content was determined and is expressed in $\mu\text{g}/10^6$ cells. UV-induced POMC (D) and *MC1R* (E) gene expression was abolished in the melan-*usf1* cell line, whereas UV-induced Endothelin-1 (F) gene expression was *USF-1*-independent. Real-time PCR was performed using mRNA from WT and null *USF-1* melanocytes at the indicated times (3 and 8 h) after UVB irradiation (50 mJ/cm²).

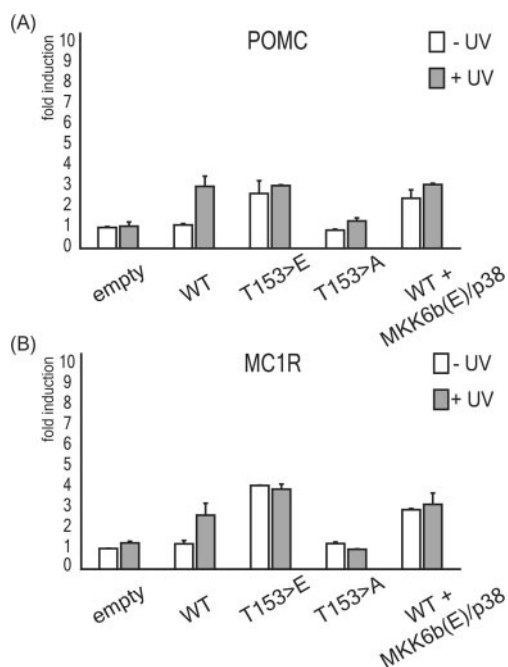


FIG. 3. Phosphorylated USF-1 and active p38 kinase are required for efficient UV-induced POMC and MC1R gene expression. Endogenous levels of POMC (A), *MC1R* (B) mRNA in null USF-1 melanocytes were analyzed by real-time PCR following transfection with vectors expressing WT or mutant forms of USF-1 (*pCMV-USF1-WT*, *pCMV-USF1-T153E*, *pCMV-USF1-T153A*) in the presence or absence of co-expressed MKK6b(E)/p38 kinases. The T153E USF-1 mutant mimics the p38-activated USF-1 form, whereas the T153A USF-1 mutant mimics the non-phosphorylated USF-1 protein. Cells were exposed to UVB irradiation (80 mJ/cm²) 45 h post-transfection where indicated, and cells were harvested 3 h later (*i.e.* 48 h post-transfection). Results are expressed in -fold induction compared with values obtained following transfection with the empty pCMV vector.

E-box motifs (CANNTG) that would potentially bind USF-1. Of these only a small number are conserved in humans, mouse, and rat species, namely the -741 CAGCTG and -461 CATGTG E-box motifs in the *MC1R* promoter and the CAGGTG element at -200 in the POMC promoter (Fig. 4A). Initial *in vitro* binding assays (Fig. 4B) using radiolabeled oligonucleotide probes corresponding to the -200 and -461 E-box motifs from the POMC and *MC1R* promoters, respectively, together with extract from 501 mel melanoma cells revealed a specific DNA-protein complex that was supershifted with anti-USF-1 antibody, but not with a control antibody (not shown). Similar results were observed with the -183 Tyrosinase E-box element, which is known to bind the USF-1 transcription factor (27). No protein-DNA interaction was observed with the -741 *MC1R* E-box element or with a non-conserved E-box located at -596 (not shown).

To provide direct evidence that the USF-1 transcription factor interacts *in vivo* with the POMC and *MC1R* promoters, we performed a chromatin immunoprecipitation assay using a specific anti-USF-1 antibody and a nonspecific IgG as a negative control. Three different cell types (mouse keratinocytes and melanocytes and human melanoma) that express the POMC, *MC1R*, and Tyrosinase genes to different levels were used to assess the binding of USF-1. After cross-linking and immunoprecipitation, the recovered DNA was subject to PCR using primers spanning the USF-1 binding E-box motifs in the POMC and *MC1R* promoters (Fig. 4A). As a positive control, the chromatin immunoprecipitation data for the POMC and *MC1R* genes were compared with those for Tyrosinase, a known USF-1 target gene that is expressed specifically in the melanocyte lineage (27). The *HSP70* promoter was used as a

negative control. The results are shown in Fig. 4C. In the human 501 mel melanoma cell line, a specific PCR product corresponding to USF-1-bound POMC, *MC1R*, or Tyrosinase promoter DNA was readily detected using the anti-USF-1 antibody, but not with the IgG control. No PCR product was observed for the *HSP70* promoter or for the other promoters if PCR primers were used that did not span a conserved E-box motif (data not shown). Although the efficiency of the immunoprecipitation was significantly reduced in the mouse XB2 keratinocyte and melan-a melanocyte cell lines compared with the human 501 mel cells, the results were similar with the exception that no USF-1 chromatin immunoprecipitation was observed at the Tyrosinase promoter in the XB2 keratinocytes, most likely because Tyrosinase expression is limited to the melanocyte lineage.

In Vitro Transcriptional Regulation of POMC and MC1R Genes—To determine whether USF-1 binding to E-box motifs in the POMC and *MC1R* promoters was relevant for regulation of these genes in response to UV irradiation, transient transfection experiments were performed in 501 mel cells. POMC and *MC1R* proximal promoters linked to the pGL3-luciferase reporter plasmid were used to assess whether both promoters are UV-inducible in a USF-1- and E-box-dependent fashion. Cells transfected with WT or E-box-mutated POMC or *MC1R* promoter reporters were exposed to UVB irradiation and luciferase activity determined. The results (Fig. 5A) showed that, although expression from the WT POMC and *MC1R* promoters was induced 3- and 5-fold, respectively, following UVB irradiation, mutation of the -200 POMC E-box element and the -461 *MC1R* one abrogated UV-induced gene expression, indicating that the USF-1-bound E-box motifs are indeed UV target sites. By contrast, deletion of the -741 *MC1R* E-box motif, which is conserved in human and mouse species but which failed to bind the USF-1 transcription factor *in vitro*, did not affect the UV response. The requirement of the stress-activated form of USF-1 in POMC and *MC1R* gene regulation was further confirmed using this reconstituted system. POMC and *MC1R* promoter reporters were highly induced in the presence of the constitutive activated USF-1 form (T153E), whereas WT USF-1 had no effect. Moreover, mutation of the USF-1-specific binding site abrogated gene expression (Fig. 5B). Taken together, these results suggest that stress-activated USF-1 and specific E-box are critically required for activation of the *MC1R* and POMC genes in response to UV irradiation.

DISCUSSION

The tanning response is the major molecular response toward UV irradiation. It protects the skin and avoids oncogenic transformation to a certain extent. It is thus important to understand how target proteins mediate the transcriptional response to UV irradiation and to general stress signals. We have previously shown that USF-1 is an *in vivo* target for the stress-responsive p38 kinase (27). In this study, we demonstrated that the USF-1 transcription factor is a general key regulator of UV-induced gene expression, implicated at several steps of the tanning response. Our results elucidate the general melanocyte pigmentation process in response to UV induction.

The α -melanocyte-stimulating hormone, encoded by the Pro-opiomelanocortin gene, and its receptor, encoded by the melanocortin receptor 1 (*MC1R*), are two upstream partners of the pigmentation cascade (4, 7). Using real-time PCR, we were able to quantify and characterize POMC and *MC1R* transcripts. Levels of both transcripts increased following exposure to physiological doses of UVB irradiation in all cell lines tested (XB2 keratinocytes, melan-a melanocytes, and 501 mel melanomas), with differing kinetics. In accordance with these data, POMC and *MC1R* promoter-luciferase reporters were both activated

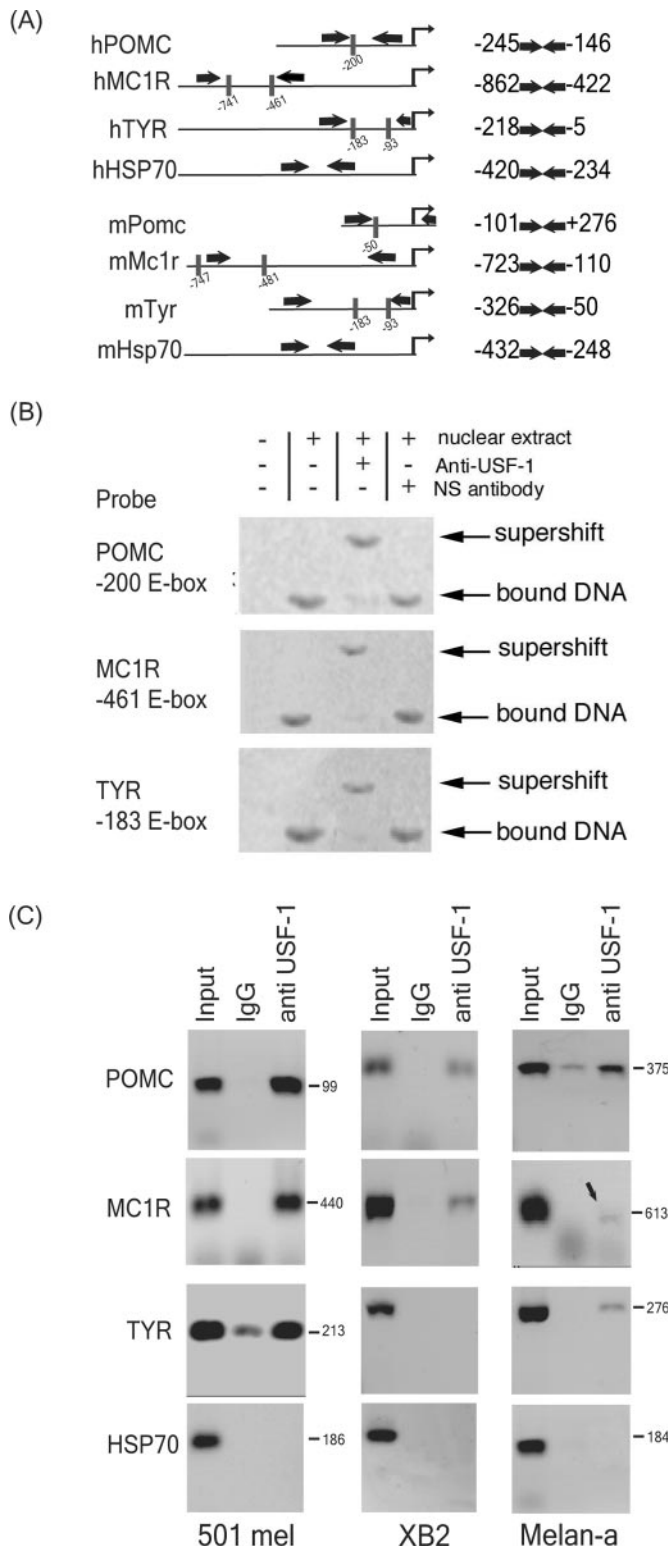


FIG. 4. The USF-1 transcription factor interacts *in vivo* and *in vitro* with a DNA control element within the POMC and MC1R promoters. A, schematic representation of human (*h*) and mouse (*m*) POMC, MC1R, TYR, and Hsp70 promoters. E-box motifs in human and mouse sequences are shown in black. Positions of PCR primers (→←) used for the chromatin immunoprecipitation assays are shown relative to the transcription start sites of each promoter. The slight numeration discrepancy between the human and mouse POMC promoters is because of the presence of an additional non-conserved sequence in the human POMC promoter upstream from the start site. B, USF-1 binds specific E-box motifs within the human POMC and MC1R promoters. *In vitro* DNA binding assays were performed using 501 mel nuclear extracts. Oligonucleotides used as probes were centered on the -200 POMC-E-box, the -461 MC1R-E-box, and the -183 Tyr-E-box. For

following UV induction. Moreover, UV-induced gene expression is dependent on the stress-responsive p38 family kinases, as SB 203580, a specific inhibitor of the closely related p38 α and p38 β kinases (34), abrogated UV-induced transcription of POMC and MC1R.

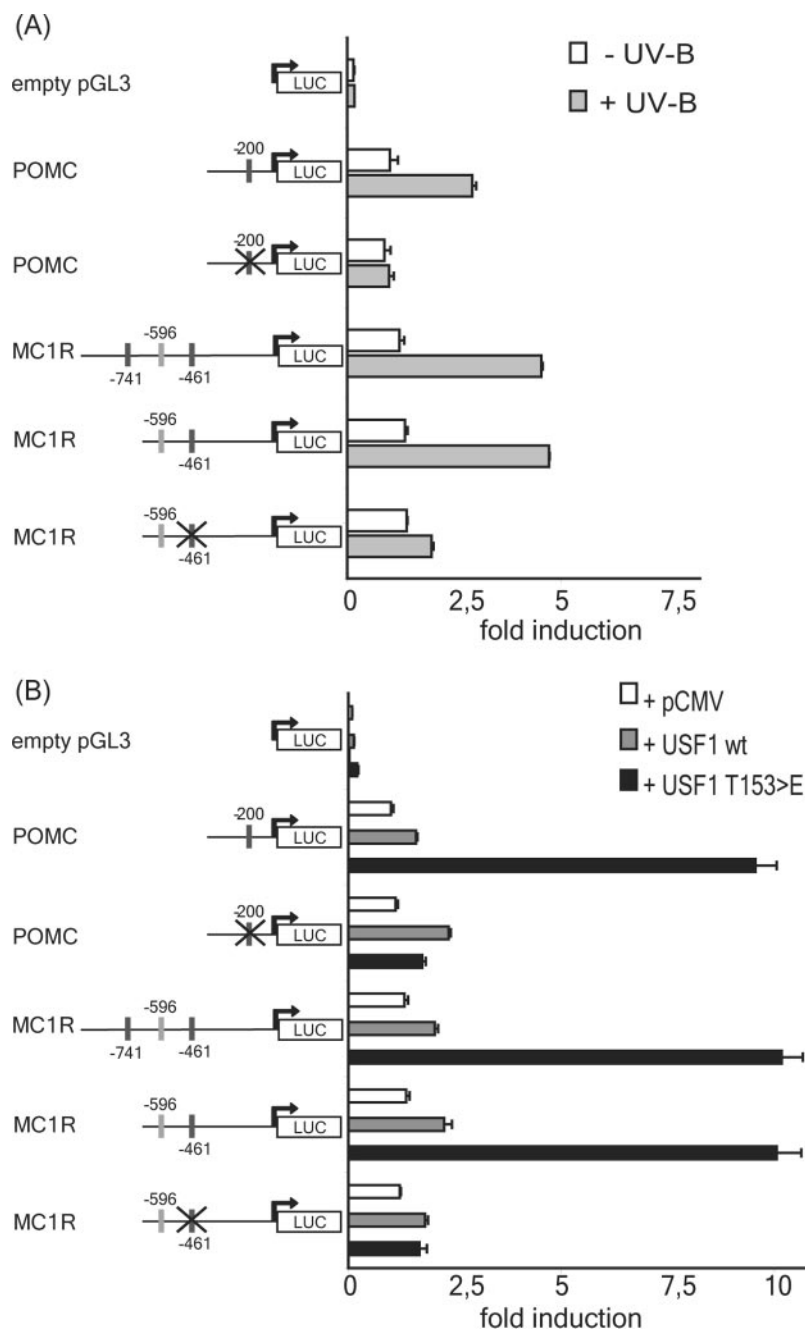
The establishment of an immortal USF-1 knockout melanocyte line (39) allowed us to study gene expression profiles following UV induction in the absence of one of the stress-responsive p38 kinase targets while keeping the p38 kinase cascade intact. POMC and MC1R gene expression following UV irradiation was abrogated in the USF-1 knockout melanocyte strain, suggesting a major role for the USF-1 transcription factor. The involvement of the activated phosphorylated form of USF-1 was confirmed by the fact that UV-induced POMC and MC1R expression was restored in the USF-1-depleted line following transfection of the T153E-USF-1 expression vector mimicking the p38-activated USF-1 form.

Interestingly, the expression of POMC and MC1R following UV induction was dependent on the presence of the USF-1 transcription factor, whereas their constitutive gene expression does not seem to be. Similar constitutive levels of POMC and MC1R transcription were indeed observed in WT melanocytes (melan-a) and in USF-1-depleted ones. Moreover, the constitutive expression levels of POMC and MC1R were not affected when USF-1 knockout cells were transfected with the WT-USF-1 expression vector alone. Introduction of the WT-USF-1 expression vector into the USF-1-depleted cell line resulted in the up-regulation of POMC and MC1R genes only in the presence of UV irradiation. A similar gene regulation model involving the E-box target motif was observed for the Tyrosinase gene. The tissue-specific microphthalmia transcription factor is required for constitutive gene expression, and the ubiquitously expressed USF-1 transcription factor is responsible for UV-induced Tyrosinase gene expression (27). Consistent with this dual regulation model, the -461 MC1R conserved E-box motif has been shown to bind the Mitf transcription factor, resulting in transcriptional activation (40). This regulation model is possible because of the nature of the USF-1 and Mitf transcription factors. Both proteins are members of the evolutionarily conserved family of b-HLH-LZ transcription factors (41–43). Members of this family interact with symmetrical E-boxes with the consensus sequence 5'-CANNTG-3' (44–46). The specificity of the E-box binding site toward the b-HLH-LZ family members is conferred by the composition of the residues within and outside the core E-box motif (41). However, a defined E-box motif can be the target site for different transcription factors. The relative amounts of the potential transcription factors and their binding affinities, which can be modified by post-translational modifications, will differ at particular time points, leading to a specific protein-DNA interaction (28, 35). We thus hypothesize that following UV irradiation, phosphorylation of the USF-1 transcription factor renders possible its specific interaction with target E-box motifs.

The shortness of the E-box sequence, six nucleotides with potential degenerate sites, favors its broad distribution throughout the genome. However, only a restricted set of E-box

supershift experiments, DNA binding reactions were incubated for a further 45 min on ice with a polyclonal anti-USF1 antibody or non-specific IgG. Retarded complexes are indicated, and the supershifted complexes are indicated by a black arrow. C, USF-1 binds *in vivo* the POMC and MC1R promoters. Chromatin immunoprecipitation assays were performed on XB2 keratinocytes, melan-a melanocytes, and 501 mel melanoma cells using anti-USF1 antibody or non-specific IgG. Recovered DNA was subjected to PCR using primers specific for POMC and MC1R promoters and centered on the conserved E-box motifs as shown in panel A. Specific primers for the *Tyr* promoter were used as positive control, and specific primers for *Hsp70* were used as negative control.

FIG. 5. Transcriptional regulation of the human POMC and MC1R luciferase-reporter. A, POMC and MC1R luciferase-reporters respond to UV irradiation. A POMC luciferase-promoter extending from positions -245 to $+1$ and two MC1R luciferase-promoters extending from positions -862 and -724 to $+1$ were transfected into 501 mel cells, along with a mutated form affecting -200 E-box POMC luciferase-promoter and -461 E-box MC1R luciferase-promoter. E-box motifs conserved in human and mouse sequences are shown in black (■), whereas non-conserved ones are in white (□). Mutated E-box are cross-marked (×). Cells were exposed to UVB irradiation (80 mJ/cm^2) 24 h post-transfection when indicated. Cells were harvested 48 h post-transfection, and luciferase activity was determined and expressed as -fold induction compared with the controls (empty vectors). B, specific E-box motifs within the POMC and MC1R promoter-luciferase target the constitutive-activated USF-1 transcription factor. 501 mel cells were transiently transfected with WT promoter-luciferase constructs and mutated E-box motif (×) promoter-luciferase constructs. Cells were co-transfected with vectors expressing WT USF-1 (*pCMV-USF-1-WT*) or with the T153E-USF-1 form, which mimics phospho-activated USF-1 transcription factor. Transcription levels are expressed as -fold induction compared with the controls (empty vectors).



motifs are actual DNA control elements. One way to identify such elements to a certain extent would be to compare promoter sequences, hypothesizing that crucial regulatory elements would be conserved over evolution and present within different species. Accordingly, the DNA control E-box element of the Tyrosinase promoter gene is conserved in human, mouse, quail, and turtle (20). We thus focused on the POMC and MC1R conserved E-box motif in human, mouse, and rat promoters to design DNA interaction assays to identify USF-1 target sites. Chromatin immunoprecipitation assays using anti-USF-1 antibodies and electrophoresis DNA binding assays allowed us to define only one DNA control E-box element for each promoter, located at 461 and 200 bp upstream, respectively, from the POMC and MC1R start sites. The function of these elements was further studied by *in vitro* transfection assays, implicating for the first time these E-box motifs as UV target cis-elements. Interestingly, one conserved MC1R E-box motif, located 741 bp upstream from the start site, failed to bind *in vitro* the USF-1

transcription factor. Deletion of this motif did not significantly modify the MC1R promoter-luciferase expression level in the *in vitro* transfection assays. However, it remains possible that the -741 conserved E-box motif is a potential target site for another member of the E-box transcription factor family under specific circumstances.

The tanning response is characterized by the increased production of melanin that acts as a factor in protection against UV irradiation. The increase in melanin production is achieved by activation of genes such as MC1R and POMC that increase intracellular cAMP levels and thereby elevate the activity and expression of melanogenic enzymes. In addition to the direct effect of UV irradiation on melanocytes, a significant component of the tanning response is mediated by keratinocyte-derived paracrine signals such as Endothelin 1 and FGF2 (47–49) that are known to signal at least in part via the p38 stress-activated kinase (49), the pathway identified here as being crucial for UV-induced activation of POMC and MC1R expres-

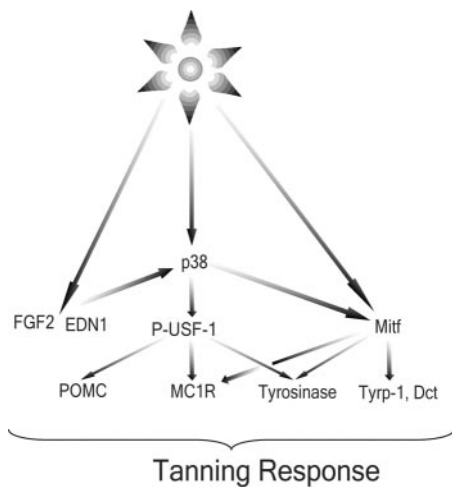


FIG. 6. Paracrine and UV regulation model of the tanning response.

sion. How EDN1 and FGF2 signaling might be linked to elevated POMC and *MC1R* expression was not known. Indeed, the fact that the *MC1R* promoter is bound and regulated by Mitf (40), a known p38-responsive transcription factor, seemed to point to Mitf as the likely candidate. However, the fact that melanocytes derived from USF-1-null mice retain their capacity to activate the p38 signaling pathway and *EDN1* expression, but are defective in their ability to activate POMC and *MC1R* expression in response to UV irradiation, unequivocally defines USF-1 as a key component of the tanning response. Interestingly, α -MSH, encoded by the POMC gene, acts synergistically with Endothelin-1 and FGF2 in promoting melanogenesis (50). Because activation of the p38 kinase by Endothelin-1 and FGF2 would lead to increased activity of USF-1 and thereby activation of POMC expression and increased MSH expression, there exists a potential positive feedback loop within the tanning response that would facilitate the accumulation of protective pigment in response to UV irradiation and keratinocyte signaling to melanocytes. Our results have provided new insights into the molecular pathways and cross-talk implicated in gene regulation upon solar irradiation, leading to a general tanning response model (Fig. 6).

In addition to their role in pigmentation, α -MSH and USF-1 mediate many diverse physiological actions, including immunomodulation and anti-inflammatory effects (51), which are stress response events, and cell survival and apoptosis (52, 53). This suggests that USF-1 and α -MSH may interact further at the molecular level. Their cooperation may thus not be limited to the pigmentation process and may be much more complex in response to a stress signal. Use of the USF-1 knockout melanocyte cell line should help us to understand the molecular mechanisms underlying these processes.

Acknowledgments—We thank Jiahan Han for providing various expression vectors, Vincent Hearing for the Tyr, Tyrp1, and Dct antibodies, Alexandra Henrion for assistance in the USF-1 knockout mice preparation, and Simon Hill for expert technical assistance in the melanocyte melan-*usf1*. We also thank Prof. Jean-Yves Le Gall for critical reading of the manuscript and Dr. M. E. Huang for helpful discussion.

REFERENCES

- Arlett, C. F., Lowe, J. E., Harcourt, S. A., Waugh, A. P., Cole, J., Roza, L., Diffey, B. L., Mori, T., Nikaïdo, O., and Green, M. H. (1993) *Cancer Res.* **53**, 609–614
- Kvam, E., and Tyrrell, R. M. (1997) *Carcinogenesis* **18**, 2379–2384
- Kadokaro, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A., and Abdel-Malek, Z. A. (2003) *Pigm. Cell Res.* **16**, 434–447
- Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Suzuki, I., Alcali, C., Harriger, M. D., Boyce,

- S. T., Urabe, K., and Hearing, V. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1789–1793
- Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J. M., and Ichihashi, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1313**, 130–138
- Tsatmalia, M., Wakamatsu, K., Graham, A. J., and Thody, A. J. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**, 466–469
- Thody, A. J. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**, 217–229
- Hadley, M. E., and Haskell-Luevano, C. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**, 1–21
- Bastiaens, M., ter Huurne, J., Gruis, N., Bergman, W., Westendorp, R., Vermeer, B. J., and Bouwes Bavinck, J. N. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1701–1708
- Rana, B. K., Hewett-Emmett, D., Jin, L., Chang, B. H., Sambughin, N., Lin, M., Watkins, S., Bamshad, M., Jorde, L. B., Ramsay, M., Jenkins, T., and Li, W. H. (1999) *Genetics* **151**, 1547–1557
- Flanagan, N., Healy, E., Ray, A., Phillips, S., Todd, C., Jackson, I. J., Birch-Machin, M. A., and Rees, J. L. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2531–2537
- Healy, E., Jordan, S. A., Budd, P. S., Suffolk, R., Rees, J. L., and Jackson, I. J. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2397–2402
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L., and Thody, A. J. (1995) *Nat. Genet.* **11**, 328–330
- Sturm, R. A., Duffy, D. L., Box, N. F., Chen, W., Smit, D. J., Brown, D. L., Stow, J. L., Leonard, J. H., and Martin, N. G. (2003) *Pigm. Cell Res.* **16**, 266–272
- Palmer, J. S., Duffy, D. L., Box, N. F., Aitken, J. F., O’Gorman, L. E., Green, A. C., Hayward, N. K., Martin, N. G., and Sturm, R. A. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 176–186
- Chhajlani, V., and Wikberg, J. E. (1992) *FEBS Lett.* **309**, 417–420
- Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 694–702
- Busca, R., and Ballotti, R. (2000) *Pigm. Cell Res.* **13**, 60–69
- Widlund, H. R., and Fisher, D. E. (2003) *Oncogene* **22**, 3035–3041
- Aksan, I., and Goding, C. R. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6930–6938
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8058–8070
- Scott, M. C., Suzuki, I., and Abdel-Malek, Z. A. (2002) *Pigm. Cell Res.* **15**, 433–439
- Sawadogo, M., Van Dyke, M. W., Gregor, P. D., and Roeder, R. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11985–11993
- Ferre-D’Amare, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G., and Burley, S. K. (1994) *EMBO J.* **13**, 180–189
- Ono, K., and Han, J. (2000) *Cell Signal* **12**, 1–13
- Mansky, K. C., Sankar, U., Han, J., and Ostrowski, M. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11077–11083
- Galibert, M. D., Carreira, S., and Goding, C. R. (2001) *EMBO J.* **20**, 5022–5031
- Sirito, M., Lin, Q., Maity, T., and Sawadogo, M. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 427–433
- Moro, O., Ideta, R., and Ifuku, O. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 452–460
- Therrien, M., and Drouin, J. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3492–3503
- Therrien, M., and Drouin, J. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2342–2353
- Bennett, D. C., Cooper, P. J., and Hart, I. R. (1987) *Int. J. Cancer* **39**, 414–418
- Costin, G. E., Valencia, J. C., Vieira, W. D., Lamoreux, M. L., and Hearing, V. J. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 3203–3212
- Alpert, D., Schwenger, P., Han, J., and Vilcek, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22176–22183
- Galibert, M. D., Miyagoe, Y., and Meo, T. (1993) *J. Immunol.* **151**, 6099–6109
- Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D., and Broach, J. R. (1993) *Genes Dev.* **7**, 592–604
- Seo, M., Lee, Y. I., Cho, C. H., Bae, C. D., Kim, I. H., and Juhn, Y. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24197–24203
- Steingrimsson, E., Moore, K. J., Lamoreux, M. L., Ferre-D’Amare, A. R., Burley, S. K., Zimring, D. C., Skow, L. C., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1994) *Nat. Genet.* **8**, 256–263
- Vallet, V. S., Casado, M., Henrion, A. A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A., and Vaulont, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20175–20179
- Aoki, H., and Moro, O. (2002) *Life Sci.* **71**, 2171–2179
- Dang, C. V., Dolde, C., Gillison, M. L., and Kato, G. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 599–602
- Gregor, P. D., Sawadogo, M., and Roeder, R. G. (1990) *Genes Dev.* **4**, 1730–1740
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H., and Baltimore, D. (1989) *Cell* **58**, 537–544
- Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1990) *Science* **250**, 1149–1151
- Fisher, F., and Goding, C. R. (1992) *EMBO J.* **11**, 4103–4109
- Halazonetis, T. D., and Kandil, A. N. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6162–6166
- Imokawa, G., Kobayashi, T., Miyagishi, M., Higashi, K., and Yada, Y. (1997) *Pigm. Cell Res.* **10**, 218–228
- Imokawa, G., Miyagishi, M., and Yada, Y. (1995) *J. Invest. Dermatol.* **105**, 32–37
- Kozawa, O., Tokuda, H., Matsuno, H., and Uematsu, T. (1999) *J. Cell. Biochem.* **74**, 479–485
- Abdel-Malek, Z., Kadokaro, A. L., Terzieva, S., Kavanagh, R., and Hauser, J. (2004) *Pigm. Cell Res.* **17**, 436
- Luger, T. A., Scholzen, T. E., Brzoska, T., and Bohm, M. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **994**, 133–140
- North, S., Espanel, X., Bantignies, F., Viollet, B., Vallet, V., Jalinet, P., Brun, G., and Gillet, G. (1999) *Oncogene* **18**, 1945–1955
- Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Bonham, M., Bisi, J., and Babiss, L. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2782–2790



UV-induced expression of key component of the tanning process, the *POMC* and *MC1R* genes, is dependent on the p-38 activated Upstream Stimulating Factor-1 (USF-1)

Sébastien Corre, Aline Primot, and Marie-Dominique Galibert

IFR 140 GFAS, CNRS UMR 6061 "Génétique et Développement", Faculté de Médecine, Université de Rennes-1, 2 av du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France



1/ Abstract

Protection against UV is afforded by the tanning response in which UV-irradiation triggers melanocytes to increase production of melanin. A key component of the tanning process is the UV-mediated induction of the *POMC* and *MC1R* genes encoding the α -melanocyte-stimulating hormone and its receptor respectively. Here we show that UV-induced activation of the *POMC* and *MC1R* promoters is mediated by p38 stress-activated kinase signalling to the transcription factor USF-1. Importantly, melanocytes derived from USF-1 $-/-$ mice exhibit a defective UV-response and fail to activate *POMC* and *MC1R* expression in response to UV-irradiation. The results define USF-1 as a critical UV-responsive activator of genes implicated in the protection from solar radiation¹.

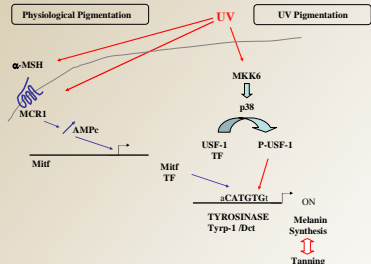


Figure 1 : Molecular factors implicated in the tanning response

Binding of α -MSH to MC1R, regulates the intracellular level of cAMP, which is involved in *Micropthalmia* (*Mitf*) gene expression. *Mitf* is required for the expression of the *Tyrosinase*, *TRP-1* (Tyrosine Related Protein) and *Dct* (Dopachrome Tautomerase) genes that encode enzymes implicated in the manufacture of the pigment melanin. *POMC* and *MC1R* gene expression are UV-inducible. Using a genetic approach, we show here that the p38-activated USF-1 transcription factor is responsible of the UV-induced *POMC* and *MC1R* gene expression, by binding on specific E-box motifs within both promoters.

3/ Experimental Procedures

In our study, different cell lines (Melan-A (Fig. 3), *Melan-usf1* mouse melanocytes, 501 mel human melanoma an XB2 keratinocytes) were used in order to determine the molecular mechanisms of UV-induced regulation of the *POMC* and *MC1R* genes in the skin. Cells were characterized for their melanin content and the localisation of pigmentation factors by immunofluorescence. After Physiological dose of UV-B induction (80mJ/cm²), cells were recovered for RNA extraction, cDNA synthesis and expression analysis of different genes using Real-Time PCR (SYBR Green).

In order to detect a potential interaction of the transcription factor USF-1 with *POMC* and *MC1R* promoters genes, chromatin immunoprecipitation and gel shift assays were performed. We decided to focus on conserved E box motifs between rat, mice and human species within *POMC* and *MC1R* promoters, assuming that they were likely to bind USF factors.



Figure 4 : Artificiel promoters for transient Luciferase assays

2/ Introduction

Protection against UV-mediated DNA-damage is afforded by the tanning response in which UV-irradiation triggers melanocytes production of melanin. Two key upstream components of the melanin cascade process are the *POMC* and *MC1R* genes encoding the α -Melanocyte-Specific Hormone and its heterotrimeric G-protein receptor, respectively (Fig. 1). *MC1R* gene displays a large number of different alleles that contribute to the existence of the six different phenotypes (Fig. 2).



Figure 2 : Different skin phenotypes

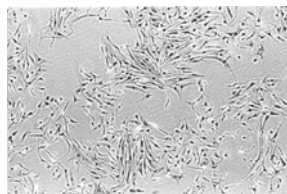


Figure 3 : Melanocyte cell line in culture

Transient transfection assays were performed to first show that USF-1 is able to restore UV-induced expression of *POMC* and *MC1R* genes in *melan-usf1* cell lines, and second to characterize USF-1 transcription efficiency in *in vitro* transcription assay. *POMC* and *MC1R* promoters were isolated by PCR, and cloned into the luciferase reporter pGL3-Basic plasmid (Promega) (Fig. 4). *POMC* and *MC1R* mutated E-boxes constructs were obtained using the GeneTailor™ Mutagenesis System (Invitrogen) with five specific oligonucleotides. 48 hours post-transfection, cells were recovered for RNA extraction as previously described. RNA was subjected to *POMC* and *MC1R* gene expression analysis using Real-Time PCR.

4/ Results

***POMC* and *MC1R* UV-response**

Constitutive and UV-induced *POMC* and *MC1R* expression levels were examined in different skin cell types, using real time PCR. *POMC* and *MC1R* gene expression were increased in response to physiological dose of UVB irradiation (50 mJ/cm² UVB), although kinetics and amplitudes differed (Table 1).

***p38* kinase pathway mediates *POMC* and *MC1R* UV-induced expression**

UV-induced expression of *POMC* and *MC1R* genes were examined in 501mel cells in the presence or absence of the specific p38 inhibitor (SB203580). The results (data not shown) indicated that the p38 kinase inhibitor abrogated UV-induction of both the *POMC* and *MC1R* gene expression, which strongly suggests that the p38 stress-activated protein kinase is implicated in the UV-responsiveness of *POMC* and *MC1R* gene expression.

Cell type	USF-1	Constitutive expression	UVB inducibility
XB2	<i>POMC</i>	303	x2.8 at 24h
	<i>MC1R</i>	1037	x3 at 3h
Melan-a	<i>POMC</i>	100	x7.2 at 3h
	<i>MC1R</i>	1374	x7.9 at 3h
501 mel	<i>POMC</i>	19	x7.2 at 8h
	<i>MC1R</i>	971	x7.7 at 8h

Table 1 : UV-induced regulation of the pigmentation genes

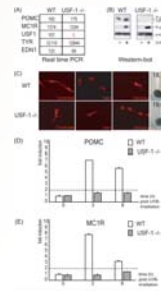


Figure 5 : *melan-usf1* response to UV

***USF-1* interacts with *POMC* and *MC1R* promoters**

In silico analysis, revealed that both the *MC1R* and *POMC* promoters displayed several E-box motifs (CANNTG) that would potentially bind USF-1. To provide direct evidence that the USF-1 transcription factor interacts *in vivo* with the *POMC* and *MC1R* promoters, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays and gel shift assays were performed. Results (data not shown) indicated an interaction of USF-1 with *POMC* and *MC1R* promoters on specific E-box motifs, which are conserved between species (rat, mice, human).

***In vitro* transcriptional regulation of *POMC* and *MC1R* genes**

To determine whether USF-1 binding to E-box motifs in the *POMC* and *MC1R* promoters was relevant for regulation of these genes in response to UV, transient transfection experiments were performed in 501 mel cells. The results (Fig. 6A) showed that, while expression from the WT *POMC* and *MC1R* promoters was induced by 3- and 5-fold respectively following UVB irradiation, mutation of the -200 *POMC* E-box element and the -461 *MC1R* one, abrogated UV-induced gene expression, indicating that the USF-1 bound E-box motifs are indeed UV-target sites. *POMC* and *MC1R* promoter reporters were highly induced in the presence of the constitutive activated USF-1 forms (T153E), while WT USF-1 had no effect. More over, mutation of the USF-1 specific binding site abrogate gene expression (Fig. 6B). These results suggest that USF-1 and specific E box are critically required for activation of the *MC1R* and *POMC* genes in response to UV

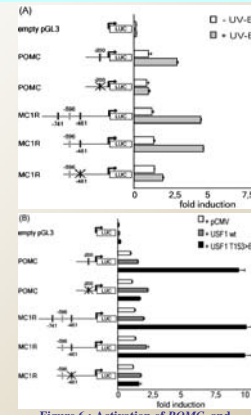


Figure 6 : Activation of *POMC* and *MC1R* expression by USF-1

5/ Conclusion

We demonstrated for the first time that the USF-1 transcription factor is a general key regulator of UV-induced gene expression, implicated at several steps of the tanning response. P38 activated-USF-1 transcription factor is thus implicated in *POMC* and *MC1R* expression regulation. Results obtained for *Tyrosinase*, *Trp1* and *Dct* genes expression² are correlated in a global UV-induction expression by USF-1. Interestingly, α -MSH, acts synergistically with Endothelin-1 and FGF2 in promoting melanogenesis. Taken together, our results provide new insights into the molecular pathways and crosstalk implicated in genes regulation upon solar irradiation leading to general tanning response model (Fig. 7).

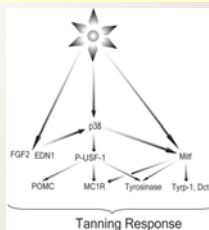


Figure 7 : Model for tanning process

¹ Corre, S., A. Primot, et al. (2004). "UV-induced expression of key component of the tanning process, the *POMC* and *MC1R* genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1)." *J Biol Chem* 279(49): 51226-33.
² Galibert, M. D., S. Carneira, et al. (2001). "The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression." *EMBO J* 20(17): 5022-31.
³ Corre, S., Mekideche, K., et al. (2005). "In vivo and ex vivo tanning response studies: two potent molecular models." *J Invest Dermatol* (in preparation).

4> Etude *in vivo* et *ex vivo* de la pigmentation, deux modèles moléculaires intéressants

4.1> Introduction

Les analyses moléculaires *in vitro*, réalisées à l'aide de culture cellulaire constituent un modèle simplifié, permettant de décortiquer les mécanismes propres à un seul type cellulaire, ne tenant pas compte de l'hétérogénéité tissulaire avec l'importance des interactions. Il nous a donc paru important de valider *in vivo* le modèle de réponse pigmentaire établi précédemment (Corre, Primot et al. 2004). Notre choix technique s'est porté vers une étude *in vivo*, respectant les structures tissulaires 3D, les interactions cellulaires et dépourvue d'étapes *in vitro*, par rapport à des modèles de peau reconstituée (Cario-Andre, Briganti et al. 2002; Duval, Schmidt et al. 2003) ou de cocultures (Regnier, Duval et al. 1999; Duval, Regnier et al. 2001).

Dans ce but, nous avons mis en place un protocole de photobiologie en collaboration avec les services de Dermatologie et de Chirurgie plastique du CHU de Rennes, au cours duquel six patientes de phototype II ou III (30-68 ans), admises pour une plastie abdominale réparatrice, ont pris part après consentement éclairé à l'étude. L'analyse par RT-PCR en temps réel de l'expression des différents gènes de la pigmentation 5 heures après induction UV (2 et 4 J/cm² = 1 DEM), réalisée à l'aide d'un simulateur solaire ([Figure 24](#)), a permis de mettre en évidence une induction de l'expression des gènes ; confirmant ainsi les résultats *in vitro*.

Afin de se dégager de la complexité administrative et logistique d'une étude exclusivement *in vivo*, la réponse pigmentaire a été par la suite analysée après la mise en culture d'explants. Une irradiation similaire a été réalisée à l'issue de 16 heures de culture. Les profils d'expression en réponse aux UV sont comparables à ceux obtenus *in vivo*. Le modèle *ex vivo* une fois validé présente l'avantage de pouvoir tester différentes molécules biologiques.

La reproductibilité et la cohérence des résultats obtenus *in vivo* et *ex vivo* valident ces techniques expérimentales comme des modèles de réponse pigmentaire, et pourront vraisemblablement être utilisés pour tester différentes fonctions biologiques (inflammation, vieillissement de la peau...) ainsi que des composés pharmacologiques ou cosmétiques.

4.2> Copie du 4^{ème} article



Figure 24: Simulateur solaire

In vivo and ex vivo UV-induced analysis of pigmentation gene expressions

To the Editor:

Skin exposure to solar radiation initiates complex molecular processes. These include the protective tanning response, local inflammation, immune suppression, and DNA-damage that can lead to skin carcinogenesis (De Fabo *et al.*, 2004). The tanning response protects against UV-mediated DNA damage, with UV irradiation triggering production of melanin by melanocytes, which is then transferred to the neighboring keratinocytes. To investigate pigmentation process, numerous *in vitro* models have been developed, including cultured cell lines, melanocytes-keratinocytes co-culture, reconstructed epidermis and skin-biopsies (Corre *et al.*, 2004; Duval *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2003; Hofmann-Wellenhof *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2002). However, gene expression level, involved in the UV response has yet been determined, using cell tissue culture models (Chakraborty *et al.*, 1996; Corre *et al.*, 2004; Galibert *et al.*, 2001; Gilchrest *et al.*, 1996; Nishioka *et al.*, 1999). In order to examine UV-induced gene expression in respect to cells organization and cooperation, we investigate the *in vivo* UV response, using irradiated skins biopsies and irradiated cultured skin explants. For that purpose, six women (mean age 48 years) were included in a photo-biological protocol, following ethical approval. We classified two and four patients as phototype II and III respectively, following detailed interview about skin response to sunlight (Fitzpatrick, 1988). Solar-simulated radiation (SSR) was generated by a UV polychromatic light source (Dermolum UM-W1, Müller Elektronik[®], Moosinning, Germany), equipped with a Schott WG 305 filter, resulting in 5% UVB and 95% UVA containing spectrum. The simulator irradiance was 100 mW/cm² (Müller Elektronik[®] dosimeter). UV radiation was delivered at 2 and 4 J/cm² on the abdomen five hours before plastic surgery, to allow significant UV-induced gene transcription. The value of 2 J/cm² was chosen as it corresponds to the Minimal

Erythematous Dose (MED) of our population in Brittany (France), composed essentially of photo type II and III skins. Cultured skin explants were prepared from non-UV-irradiated skin biopsies, immediately after surgery. After removal of the hypodermis, epidermal/dermal skin explants (diameter: 0,8 cm – thickness: 5 mm) were placed, dermal side down, in 24-well-culture-plates. Skin explants dermis were thus in contact with the medium (Biopredic International[®], Rennes, France), while the epidermis were facing the atmosphere (5% CO₂-37°C).

Keratinocytes and melanocytes, most critical pigmentation genes (Imokawa, 2004; Vance and Goding, 2004), include the *pro-opiomelanocortine (POMC)* and its receptor (*MC1R*), the *basic-fibroblast growth factor (FGF2)* and the *Endothelin (EDN1)* paracrine factors genes, the Microphthalmia encoded transcription factor gene (*MITF*), and genes implicated in pigment manufacturer (*TYR*, *TRP1*, *DCT*). Their relative gene expressions were analyzed using Real Time RT-PCR (SYBR[™] Green PCR Master Mix, Applied Biosystems[®]) (Corre et al., 2004) the most accurate technology for mRNA-quantification (Livak and Schmittgen, 2001). SSR (2 and 4 J/cm²) delivered *in vivo* and *ex vivo* to photo type II and III skins, caused a significant dose-dependent up-regulation (Fig 1) in accordance with previously reported *in vitro* tissue culture data (Corre et al., 2004; Galibert et al., 2001) and with *in vivo* fold increases being about two times higher than the *ex vivo* ones. Although photo-types II and III are considered as poor and mild tanners respectively, no significant difference could be observed between both skin photo types, neither in basal pigmentation-gene expression level, nor in the UV-induced gene expression response, 5 hours post-irradiation, allowing us to present gene expression results as the mean of data from all six biopsies (Fig 1). However, patients did not behave equally in term of local inflammation, and one photo type II patient presented a slight erythema on the 4 J/cm² irradiated area five hours after irradiation. Although, one cannot drawn any conclusion from one volunteer, this data are

in accordance with type II and III skins specific UV-response, leading in the end to specific tan. Indeed, tanning is a complex growing process, which is not limited to gene expression regulation and do include modulation of protein activities (MC1R, Tyrosinase...). Tanning is thus time and dose dependent, requiring secondary stimuli that include additional UV hits and paracrine factors, justifying the need of an adequate and flexible protocol represented by our *ex vivo* approach. Indeed, incubation of cultured skin explants with α -MSH, FGF-2 and Endothelin, activates signaling pathways (Halaban *et al.*, 1988; Imokawa, 2004) leading to a dose dependant increase of *POMC*, *MC1R*, *MITF*, *TYR* gene expressions (data not shown) mediating in fine, specific skin responses.

Pre-incubation of the specific p38 kinase inhibitor with skin explants confirmed that the UV-induced expression of *POMC*, *MC1R* and *TYR* was dependent on the p38 pathway (Corre *et al.*, 2004; Galibert *et al.*, 2001) and showed that *TRP1* and *DCT* had comparable gene expression modulation, in accordance with the presence of E-box regulatory elements within their promoter (Fig 1B). Indeed, the p38 stress-activated USF-1 transcription factor and critical E-box motifs have been shown to be key elements of UV-induced gene expression. In contrast, UV-induced FGF2 and EDN1 gene expressions proved to be independent of the p38 and MAPKinase pathways (Fig 1B and data not shown). While, both p38 and MAPKinase-specific inhibitors slightly reduced UV-induced *MITF* expression (Fig 1B and data not shown). Regulation of *MITF* occurs downstream from POMC, FGF2 and EDN1 signaling. Also, there are no E-box regulatory elements present within *MITF* core promoter. Therefore, slight decrease of *MITF* expression in the presence of either p38 or MAPKinase inhibitors is likely due, to indirect and complementary processes (Fig 2). In addition, our results highlight that UV-activation of the USF-1 transcription factor is only dependant on the p38 kinase leading to the appearance of a phosphorylated form of USF-1 (Galibert *et al.*, 2001), as no modification of the *USF-1* gene expression could be observed neither with UV nor paracrine

stimulations (Fig 1 and data not shown). Indicating that post-translational modifications and active signaling pathways are crucial for pigmentation regulation process (Fig 2).

In conclusion, gene expression analysis of the pigmentation process revealed that cultured skin explants leads to robust results, with reproducible levels of gene expression ($SD < 1,2$). Indeed, the preservation of cell interactions, with no alteration of spatial structure skin, and the short culture time guarantee accurate results in reproducing the *in vivo* response. Gene expressions analysis, using *in vivo* and *ex vivo* data, allow thus to define more precisely the molecular pathways induced in response to UV (Fig 2). In addition, cultured skin explants is an adapted approach to study specific skin pigmentation disorders, inflammation, local immune response (Beattie *et al.*, 2005; Brink *et al.*, 2000), and DNA-damages (Snellman *et al.*, 2003), following UV irradiation as well as pharmacological compounds implicated in skin molecular processes.

Sébastien Corre^{*}, Karim Mekideche[†], Henri Adamski[‡], Jean Mosser^{*}, Eric Watier[§]
and Marie-Dominique Galibert^{*}.

^{*} CNRS UMR 6061 Génétique et Développement, Université de Rennes 1, IFR140, Faculté de médecine, 2 av du Pr Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes, France. [†] PROCLAIM Parc d'affaires de la Bretèche Bât B1 35760 Saint Grégoire, France. [‡] Service de Dermatologie, CHU Ponchaillou, 2, rue Henri-le-Guilloux, 35033 Rennes, France. [§] Service de Chirurgie Plastique, CHU Hôpital Sud, 1, bd de Bulgarie 35200 Rennes, France.

Address correspondence to: Marie-Dominique GALIBERT, PD, PhD, CNRS UMR 6061 Génétique et Développement, Faculté de médecine, 2 av du Pr Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes. Email: mgaliber@univ-rennes1.fr

References

- Beattie, P. E., Finlan, L. E., Kernohan, N. M., Thomson, G., Hupp, T. R. & Ibbotson, S. H.: The effect of ultraviolet (UV) A1, UVB and solar-simulated radiation on p53 activation and p21. *Br J Dermatol* 152: 1001-8, 2005
- Brink, N., Szamel, M., Young, A. R., Wittern, K. P. & Bergemann, J.: Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm Res* 49: 290-6, 2000
- Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J. M. & Ichihashi, M.: Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta* 1313: 130-8, 1996
- Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D. C., Vaulont, S., Goding, C. R. & Galibert, M. D.: UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 279: 51226-33, 2004
- De Fabo, E. C., Noonan, F. P., Fears, T. & Merlino, G.: Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res* 64: 6372-6, 2004
- Duval, C., Regnier, M. & Schmidt, R.: Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure. *Pigment Cell Res* 14: 348-55, 2001
- Duval, C., Schmidt, R., Regnier, M., Facy, V., Asselineau, D. & Bernerd, F.: The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy. *Exp Dermatol* 12 Suppl 2: 64-70, 2003
- Fitzpatrick, T. B.: The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124: 869-71, 1988
- Galibert, M. D., Carreira, S. & Goding, C. R.: The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress- responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *Embo J* 20: 5022-31., 2001
- Gilchrest, B. A., Park, H. Y., Eller, M. S. & Yaar, M.: Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 63: 1-10, 1996
- Halaban, R., Kwon, B. S., Ghosh, S., Delli Bovi, P. & Baird, A.: bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res* 3: 177-86., 1988
- Hofmann-Wellenhof, R., Smolle, J., Roschger, A., Strunk, D., Hubmer, M., Hoffmann, C., Quehenberger, F., Horn, M., Kerl, H. & Wolf, P.: Sunburn cell formation, dendritic cell migration, and immunomodulatory factor production after solar-simulated irradiation of sunscreen-treated human skin explants in vitro. *J Invest Dermatol* 123: 781-7, 2004
- Imokawa, G.: Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 17: 96-110, 2004
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8, 2001
- Nishioka, E., Funasaka, Y., Kondoh, H., Chakraborty, A. K., Mishima, Y. & Ichihashi, M.: Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis. *Melanoma Res* 9: 433-43, 1999
- Scott, M. C., Suzuki, I. & Abdel-Malek, Z. A.: Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 15: 433-9, 2002

- Snellman, E., Strozyk, M., Segerback, D., Klimenko, T. & Hemminki, K.: Effect of the spectral range of a UV lamp on the production of cyclobutane pyrimidine dimers in human skin in situ. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19: 281-6, 2003
- Vance, K. W. & Goding, C. R.: The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res* 17: 318-25, 2004

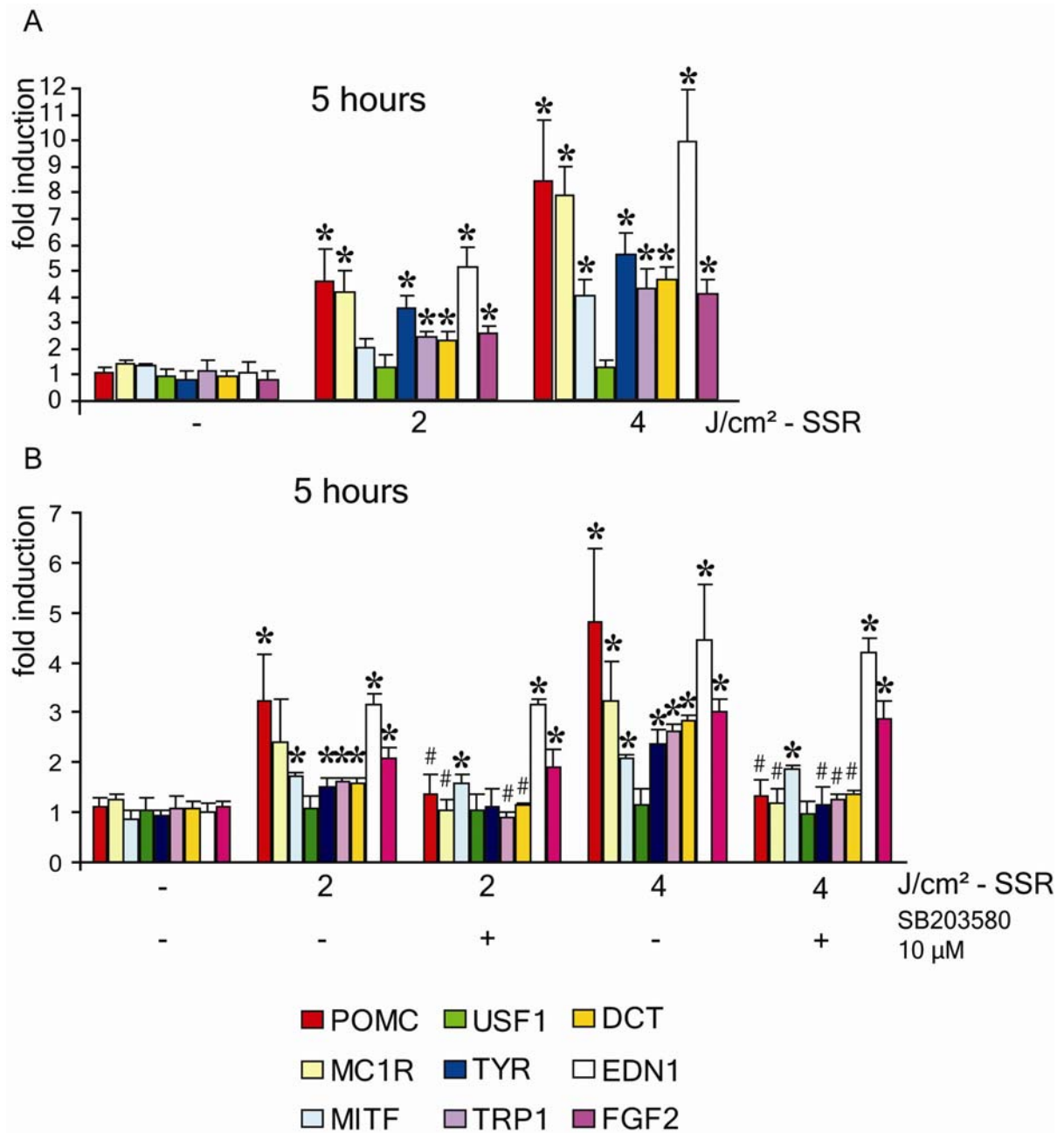
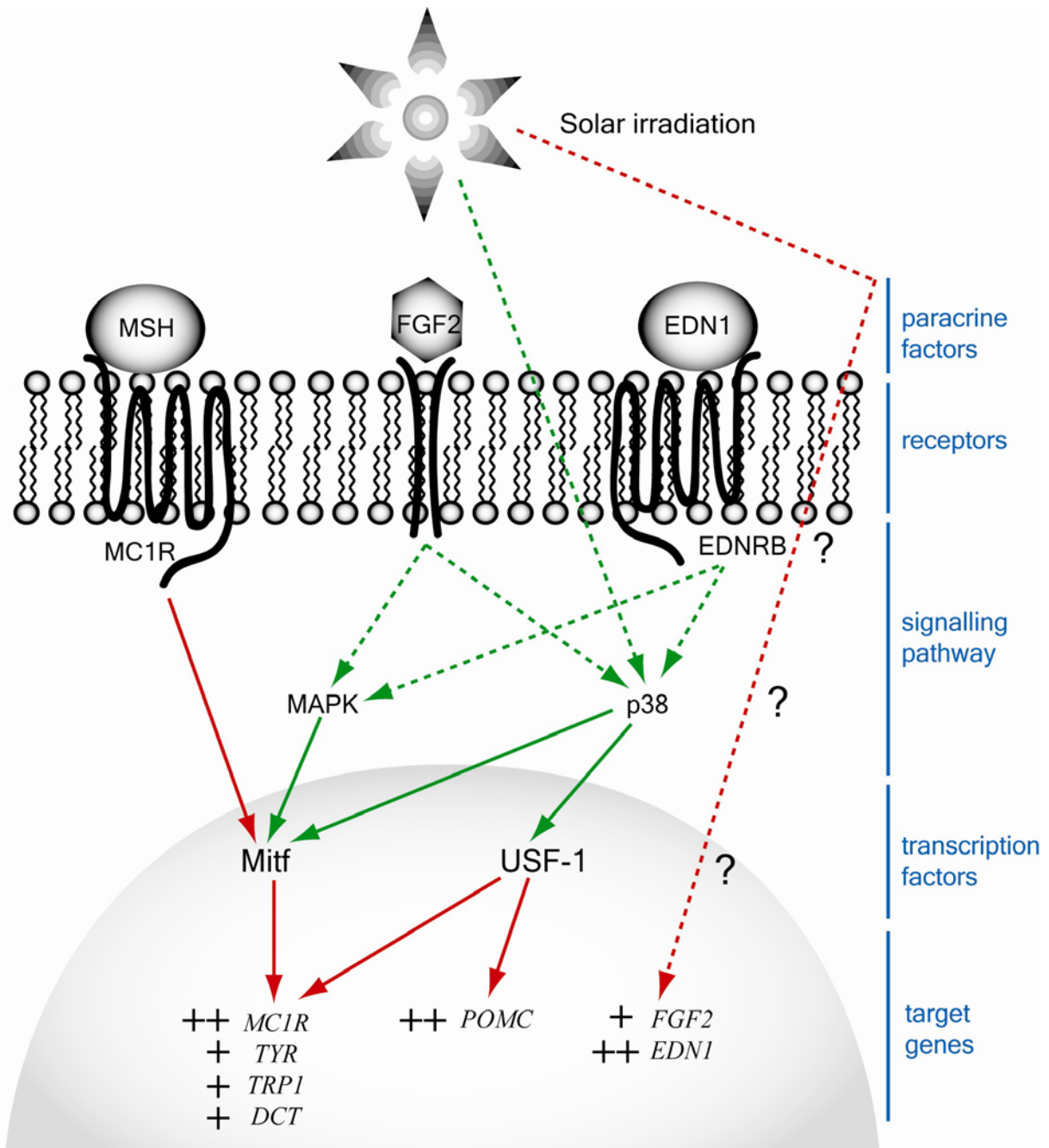


Figure 1 : *In vivo* and *ex vivo*, UV-induced gene expressions analysis

UV-induced gene expression analyses were performed by real time RT-PCR using the SYBER Green technology (Applied Biosystems) and specific forward and reverse primers. *POMC*, *MC1R*, *MITF*, *USF1*, *TYR*, *TRP1*, *DCT*, *EDN1*, and *FGF2* relative transcripts levels following UV-stimulation (2-4 J/cm²) are expressed as a fold increase compared to non-treated control skin biopsies using the Ct method (ref). Each PCR experiment was carried out at least twice and at each time point in duplicate. The data obtained from six healthy photo-type II and III volunteers are presented as mean \pm SEM, and were considered significant (*) if $p < 0.05$, using the two samples Wilcoxon test (S-PLUS 6, Insightful™). **A/ *In vivo*, UV-induced gene expression analysis:** six patients, referred for abdominal plastic surgery, were irradiated at 2 and 4 J/cm² using a UV polychromatic light source (Solar-simulated radiation (SSR): 2-4 J/cm², Dermolum UM-W1, Müller Elektronik®), composed of a 1000 W xenon lamp and a 1000 W metal halide lamp) on the abdomen five hours before surgery. Skin biopsies of irradiated and non-irradiated areas were taken immediately after plastic surgery and processed for RNA extraction (Nucleospin® RNA II extraction kit, Macherey-Nagel), and Q-RT-PCR.

B/ *Ex vivo*, UV-induced gene expression analysis: immediately after abdominal surgery, skin explants (0.8 cm diameter) of non UV-irradiated skin were taken for tissue culture. After 24 hours of culture, skin explants were irradiated at 2 and 4 J/cm² (SSR: Dermolum UM-W1, Muller Elektronik®). When indicated, skin explants were pre-treated either with p38-specific family kinase inhibitor (SB203580, 10 μ M final concentration), or with a control solution (DMSO) prior to UV irradiation. Five hours after UV induction, the skin explants were recovered for RNA extraction and pigmentation gene expression analysis



Melanin Synthesis

- Direct transcription activation
- - - → Indirect transcription activation
- Direct phosphorylation activation
- - - → Indirect phosphorylation activation
- ++ Expression level

Figure 1 : *In vivo* and *ex vivo*, UV-induced gene expressions analysis

UV-induced gene expression analyses were performed by real time RT-PCR using the SYBER Green technology (Applied Biosystems) and specific forward and reverse primers. *POMC*, *MC1R*, *MITF*, *USF1*, *TYR*, *TRP1*, *DCT*, *EDN1*, and *FGF2* relative transcripts levels following UV-stimulation (2-4 J/cm²) are expressed as a fold increase compared to non-treated control skin biopsies using the Ct method (ref). Each PCR experiment was carried out at least twice and at each time point in duplicate. The data obtained from six healthy photo-type II and III volunteers are presented as mean \pm SEM, and were considered significant (*) if $p < 0.05$, using the two samples Wilcoxon test (S-PLUS 6, Insightful™). **A/ *In vivo*, UV-induced gene expression analysis:** six patients, referred for abdominal plastic surgery, were irradiated at 2 and 4 J/cm² using a UV polychromatic light source (Solar-simulated radiation (SSR): 2-4 J/cm², Dermolum UM-W1, Müller Elektronik®), composed of a 1000 W xenon lamp and a 1000 W metal halide lamp) on the abdomen five hours before surgery. Skin biopsies of irradiated and non-irradiated areas were taken immediately after plastic surgery and processed for RNA extraction (Nucleospin® RNA II extraction kit, Macherey-Nagel), and Q-RT-PCR.

B/ *Ex vivo*, UV-induced gene expression analysis: immediately after abdominal surgery, skin explants (0.8 cm diameter) of non UV-irradiated skin were taken for tissue culture. After 24 hours of culture, skin explants were irradiated at 2 and 4 J/cm² (SSR: Dermolum UM-W1, Muller Elektronik®). When indicated, skin explants were pre-treated either with p38-specific family kinase inhibitor (SB203580, 10 μ M final concentration), or with a control solution (DMSO) prior to UV irradiation. Five hours after UV induction, the skin explants were recovered for RNA extraction and pigmentation gene expression analysis

We would like to acknowledge Pr. J Chevrant Breton (head of Dermatologic Department, Rennes Hospital, France) who made the Solar Simulator device available, Dr JC. Carlos-Rivera (Plastic Surgery Department, Rennes Hospital, France) for assistance during skin biopsies and Dr N. Rougier (Biopredic international, Rennes, France) for cultured skin biopsies technical support. We are grateful to the CNRS, the “Ligue contre le cancer” and the “ARC” foundations, which supported this work.



In vivo and ex vivo tanning response studies: two potent molecular models

Sébastien Corre¹, Karim Mekideche², Henri Adamski³, Eric Watier³ and Marie-Dominique Galibert¹

¹ CNRS UMR 6061 Génétique et Développement, Université de Rennes 1, IFR140 GFAS, Faculté de médecine, 2 avenue du Pr Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes, France. ² PROCLAIM Parc d'affaires de la Bretèche Bât B1 35760 Saint Grégoire, France. ³ CHU Pontchaillou Rennes, France.



1/ Abstract

The tanning response protects against UV-mediated DNA damage, with UV irradiation triggering production of melanin by melanocytes, which is then transferred to the neighboring keratinocytes. The molecular processes involved in the UV response have not yet been determined using *in vitro* tissue culture models^(a). Therefore, we looked at the *in vivo* UV response. Photo-type II and II/III patients, referred for abdominal surgery, were included in a photo-biological protocol. Results of pigmentation genes expression were consistent with those obtained *in vitro* with a significant dose-dependent gene expression induction after UV stimulation. We then investigated the UV-induced gene expression on whole-skin disks from each of the patients. Comparable results were obtained and only p38-dependent UV-induced genes were blocked by the p38-specific inhibitor (SB203580). Our results describe for the first time the *in vivo* molecular process of the tanning response, and show that human whole-skin disks are useful for studying the molecular mechanisms underlying the UV-response in the presence of various pharmacological drugs.

2/ Introduction

Constitutive melanin production results from activation of intracellular processes involving paracrine factors secreted by surrounding keratinocytes. In addition to the constitutive pigmentation process, UV irradiation leads to the up-regulation of several genes, which results in an overall increase in skin pigmentation. Studies have shown that pigmentation process genes, including *POMC*, *MC1R*^(a), *EDN1*, *FGF2*, *TYR*^(b), *TRP1*, *DCT* are induced after UV. Although, the Microphthalmia bHLH-LZ transcription factor is required for constitutive pigmentation, it is the p38-stress activated upstream stimulating factor-1 (USF-1) that is required for the tanning response^(a,b).

Immortalized melanocyte cell lines from coat color mutant mice can be generated, allowing the pigmentation process to be studied. However, as the pigmentation is dependent on cooperation, co-culture cell lines have been developed showing that keratinocytes play an important role in the regulation of the melanogenesis, being also much more responsive to physiological factors, such as α -MSH or UV-radiation. However, they cannot replace human molecular models. Numerous human *in vitro* models, including monocultured cell lines, melanocytes-keratinocytes co-cultured and reconstructed epidermis, have been developed to investigate human pigmentation. In our study, we have investigated the molecular processes involved in the tanning response in integrated models. We have compared the level of gene expression of the most critical pigmentation genes after *in vivo* irradiation with the level of gene expression in irradiated cultured skin biopsies

3/ Experimental Procedures

Six healthy women volunteers referred for abdominal surgery, with either skin photo-type II or II/III, took part in a photo-biological protocol. UV irradiation is delivered, with a solar simulator (Figure 1), five hours before surgery, at 2 and 4 J/cm² on the abdomen, which would correspond to the DEM and supra DEM. Skin biopsies of irradiated and non-irradiated areas are taken immediately after plastic surgery and processed for RNA extraction. The level of expression of the different pigmentation genes is analyzed by real time PCR using SYBER Green technology. The mRNA levels following stimulation are expressed as a fold increase compared to non-treated samples.



Figure 1 : Solar simulator (Dermolux UM-W1, Muller Elektronik)

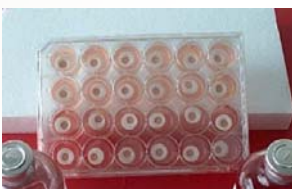


Figure 2 : Whole skin discs in culture

In parallel with *in vivo* study, skin punch biopsies (0.8 cm diameter) of non-UV-irradiated skin are taken for tissue culture (Figure. 2). After 24 hours of culture, whole skin discs are irradiated with solar simulator (2-4 J/cm²) or with UV-B source at 200 mJ/cm² up to 1000 mJ/cm². When required, whole skin discs are pre-treated either with p38-specific family kinase inhibitor SB203580, or with MAP kinase specific inhibitor U0126 or with a control solution (DMSO).

4/ Results

In vivo, UV-induced gene expression

Gene expression analysis on six healthy photo-type II and II/III volunteers, irradiated at 2 and 4J/cm², allows to classify the genes into three groups depending on the UV-response (Fig. 3). Levels of *POMC*, *MC1R* and *EDN1* gene expression increases by up to 4.5 and 9 times after 2 and 4 J/cm² irradiation doses, respectively. The levels of *MITF*, *TYR*, *TRP1*, *DCT* and *FGF2* gene expression are lower. Taken together, these *in vivo* gene expression data correlate with those obtained in cell tissue cultures.

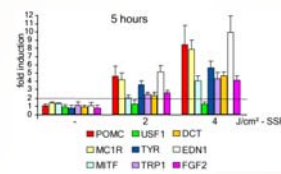


Figure 3 : In vivo, UV-induced gene expression

Ex vivo, UV-induced gene expression

In the *ex vivo* model, pigmentation genes remain UV-responsive in a dose-dependent manner as in *in vivo* model (Fig. 4). However, the level of the response is slightly reduced. We find that SB203580 doesn't abolish the UV-induced expression of *EDN1*, *FGF2* and *MITF*, whereas the UV-induced expression of *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *TRP1* and *DCT* is sensitive to SB203580.

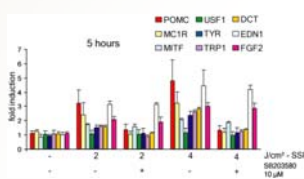


Figure 4 : Ex vivo, UV-induced gene expression

Influence of UVB irradiation

We use our *ex vivo* model to evaluate the impact of single or double UVB doses on pigmentation. Expression levels of the most relevant UV-induced pigment genes are examined 5 (Fig. 5) and 24 hours (data not shown) after UVB irradiation from 200 mJ/cm² to 1 J/cm². We find a time-dependent and a dose dependant increase in gene expression levels.

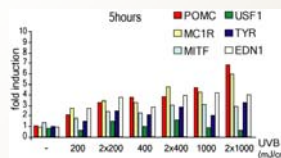


Figure 5 : Influence of UVB irradiation

Ex vivo UVB-induced pigmentation genes

SB203580 treatment abolishes the UVB-induced expression of *POMC*, *MC1R* and *TYR* both five hours (Fig. 6) and 24 hours after UVB irradiation (data not shown), whereas U0126 has no effect on gene expression. UVB-induced expression of *EDN1* and *FGF2* (data not shown), which remained constant in the presence of both inhibitors, is independent on both p38 and MAPK pathways.

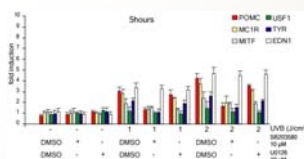


Figure 6 : Ex vivo UVB-induced gene expression

Ex vivo, paracrine factor response

After stimulation with α -MSH over 24 hours, the levels of expression of *POMC*, *MC1R*, *MITF* and *TYR* are significantly increased (respectively 4, 2.9, 2.2 and 2.6 times) in a dose dependent manner (Fig. 7), whereas the levels of expression of *USF1*, *EDN1* and *FGF2* are not modified. Finally, *FGF2* and *End1* induce a small but significant increase in *POMC* and *TYR* gene expression.

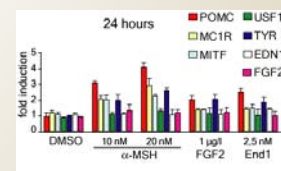


Figure 7 : Ex vivo, paracrine factor response

5/ Conclusion

The analysis of the pigmentation genes expression *in vivo* and *ex vivo* after UV-irradiation, allows us to establish an integrative model for the tanning process (Fig. 8) with cross regulation involving paracrine factors and signaling pathways. Gene expression analysis of the pigmentation process using integrated models reveals that the *ex vivo* model is very robust. Indeed, the preservation of cell interactions before studying the molecular processes, with no alteration of the skin 3D organization, and the short culture time guarantee accurate results in reproducing the *in vivo* response. Such models are therefore extremely useful for studying specific skin inflammatory or immune response, but also provide molecular model for new pharmacological compounds screening.

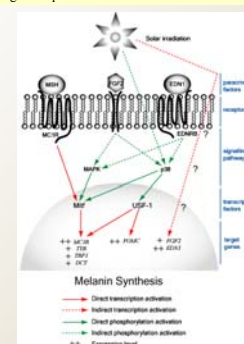


Figure 8 : UV-induced pigmentation genes regulation model

^(a) Corre, S., A. Primot, et al. (2004). "UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1)." *J Biol Chem* 279(49): 51226-33.

^(b) Galibert, M. D., S. Carreira, et al. (2001). "The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression." *EMBO J* 20(17): 5022-31.

5> Identification d'une nouvelle forme post-traductionnelle du facteur de transcription USF-1

5.1> Introduction

L'activation des voies intracellulaires dans les mélanocytes est essentielle au maintien du caractère différencié et du contrôle de la prolifération cellulaire. Dans certaines conditions, les cellules subissent différents stress de l'environnement à l'origine de dommages de l'ADN, d'un arrêt du cycle cellulaire ou d'un déclenchement de l'apoptose. La voie de la kinase p38 intervient dans cette réponse cellulaire et est activée par différents agents comme les rayonnements UV (Galibert, Carreira et al. 2001), les stress oxydatif (Robinson, Stewart et al. 1999; Xu, Konta et al. 2004), et biologique.

Le facteur de transcription USF-1 participe à la réponse au stress après phosphorylation activatrice (P-T153-USF-1) par la kinase p38, en réponse aux rayonnements UV (Galibert, Carreira et al. 2001). Une analyse plus complète de la protéine USF-1 en réponse à différents stimuli, nous ont permis de mettre en évidence une nouvelle forme de la protéine USF-1, qui apparaît en fonction de la dose et du temps d'exposition à des agents chimiques ou biologiques.

L'apparition de cette nouvelle forme, appelée M-USF-1, est dépendante de l'activation de la voie de la kinase de réponse au stress p38, laissant suggérer une phosphorylation supplémentaire de la protéine.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle fonctionnel de M-USF-1. Par expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) nous avons pu montrer que M-USF-1 était capable de se lier au niveau des promoteurs des gènes possédant des motifs consensus boîtes E. Par contre, M-USF-1 n'est pas capable d'induire l'expression des différents gènes comme P-T153-USF-1, et agirait comme un inhibiteur de la transcription.

Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives concernant les rôles du facteur de transcription USF-1 dans la régulation des gènes en réponse au stress, et permettent d'envisager de nouvelles fonctions d'USF-1 dans le contrôle des processus cellulaires. USF-1 pourrait notamment avoir différents rôles au niveau des mélanocytes, à la fois en intervenant dans la réponse pigmentaire et dans le contrôle du cycle cellulaire. Mais également, il pourrait intervenir dans le développement et la prolifération des mélanomes.

5.2> Copie du 5^{ème} article

A novel stress-responsive USF-1 form down-regulates gene expression

Sébastien Corre¹, Jacques Le Seyec², Aline Primot¹, Jean Mosser¹, Colin Goding³, Marie-Dominique Galibert¹

¹ CNRS UMR 6061 Laboratoire de Génétique et Développement, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS, 2 av du P^r Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France

² INSERM U522, Hôpital Pontchaillou, IFR140 GFAS, 2 av du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France

³ Eukaryotic Transcription Laboratory, Marie Curie Research Institute, The Chart, Oxted RH8 OTL, UK

***Corresponding author:**

Mailing address: CNRS UMR 6061 Laboratoire de Génétique et Développement, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS

2 av du P^r Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France

0033 223 234 705 / Fax : 0033 223 234 607

e-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr

Keywords: cell cycle, gene expression, USF-1, stress

Abstract

The Upstream Stimulating Factor-1 (USF-1) is a member of the evolutionary conserved basic-Helix-Loop-Helix Leucine Zipper transcription factor family, which interacts with high affinity to cognate E-box regulatory elements (CANNTG). The USF-1 protein is expressed ubiquitously and regulates a wide number of gene networks. Among them we have previously implicate USF-1 transcription factor as a key regulatory element of the tanning process, targeting up-regulation of *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *TRP-1* and *DCT* gene expressions, following UV-irradiation. Consistent with transcriptional activity modulation being dependent on post-translational modifications, we demonstrated that following UV irradiation, USF-1 gets phosphorylated on T153 residue (P-T153) We now report the identification of a new post-translational modification form of USF-1, named M-USF-1, in response to DNA-damage (UV, MMS, HU), oxidative stress (H₂O₂, menadione) and cellular infection (virus, bacteria). Although, M-USF-1 remains in the nucleus and do interact with DNA, M-USF-1 displays new gene expression regulation feature. M-USF is thus proposed to down-regulate expression of target genes implicated in pigmentation process and cell cycle regulation (*CYCLIN B1*, *CDK1*, *hTERT*). The identification of this critical stress-dependent USF-1 modification form gives new insight in understanding gene expression modulation associated with DNA-damage and cancer development.

Introduction

The *USF-1* gene is a member of the Upstream Stimulating Factor family, composed of the *USF-1* and *USF-2* related genes, assigned respectively to human chromosome 1 (1q22-q23) and human chromosome 19 (19q13) [1, 2]. Both genes encode proteins of the evolutionary conserved b-HLH-LZ super-family members that do share high homology within their basic, Helix Loop Helix and Leucine Zipper domains. Binding to specific E-box cis-element relies on basic region specifications and dimerization process, which is dependant on the integrity of the HLH and LZ structure and follows selective pairing for dimer formation [3]. USF-1 and USF-2 transcription factors do thus essentially interact with each other leading to homo- and USF-1/USF-2 hetero-dimer combinations [4].

USF-1 and *-2* genes are ubiquitously expressed, with distinct cell-protein-ratios, depending on the cell types [5]. Although, USF family members do share similar DNA binding properties, their function might not be completely redundant. Indeed, *USF-1* and *USF-2* mice knock-out display distinct phenotype, with an asymmetric influence of each factor on the expression of the other, due to an E-box regulatory element present only within the *USF-2* promoter gene [6]. Indeed, *USF1*^{-/-}/*USF2*^{-/-} double knock-out (KO) mice are lethal at the embryonic stage, as the *USF-1*^{-/+}/*USF-2*^{-/-} ones, while heterozygote *USF-1*^{-/-}/*USF-2*^{+/-} mice are viable, indicating that a minimal amount of USF protein is required for cell development, highlighting the essential function of USF transcription factors [7]. USF transcription factors participate in the transcriptional machinery at distinct levels, mediating recruitment of chromatin remodelling enzymes, interacting with co-activators and members of the Pre-Initiation Complex (PIC), leading to specific gene targeting. Indeed, because E-box motifs are well represented over promoter gene sequences, due to size sequence (6 nucleotides) and possible degenerated position CANNTG, the ubiquitously expressed USF proteins do regulate transcription of many genes. The number of which is constantly expanding, implicating the USF family in diverse networks, including immune-response(*Ig Chain*, *C4*) [8], glucid and lipid pathways (*Glucokinase*, *L-pyruvate kinase*, *Insulin*; *Fatty Acid Synthase*, *Apolipoprotein*) [9], cell cycle (*CDK4*, *CYCLIN B1*, *CDK1*) [10, 11] and cell proliferation (*hTERT*, *TGFβ2*) [12, 13]. Using a genetic approach, we have implicated the *USF-1* transcription factor as a key, stress-responsive, regulatory element of the pigmentation cascade in response to UV-stimulation [14, 15]. Indeed, following UV irradiation, *USF-1* protein is targeted for phosphorylation on the T153, leading to gene transcription activation of key upstream-components of the signalling pigmentation pathway (*POMC*, *MC1R*), and genes implicated in pigment manufacturer (*TYR*, *TRP-1* and *DCT*) [16], while *USF-1* KO

melanocyte cell line do no more respond to UV induction [14]. Phosphorylation of the T153-USF-1 (named P-T153-USF-1) is an early response to UV-induction, mediated by the stress-responsive p38 kinase, which activation has proved to be inhibited by the SB203580 specific compound, leading to abrogation of the T153-USF-1 phosphorylation.

We now describe a new stress-responsive form of the USF-1 transcription factor named M-USF-1. Although the P-T153 USF-1 and the M-USF-1 forms do interact with DNA, and are both downstream target of the stress activated p38 kinase, their modification do occurs independently in respect to cell context, leading to distinct gene regulation function. Our data suggest thus for the first time a new gene regulation model of USF-1 target gene networks.

Results

Identification of a new stress-responsive M-USF-1 form

We have shown previously, that the ubiquitously expressed USF-1 protein is a downstream target of the UV-activated p38 kinase, leading to the appearance of a phospho-USF-1 form (P-T153-USF-1), which can be separate by SDS-PAGE, and which is abrogated in the presence of the specific p38-kinase inhibitor (SB203580, 10 μ M) (Fig. 1A) [15]. Similarly, P-T153-USF1 form could be observed following Methyl Methane Sulfonate (MMS 0,2 mM), and Menadione (0,1 μ M) cell stimulations (B16 and 501 melanoma cells, fibroblast), in combination with the appearance of the activated p38 kinase form (P-p38) (Fig. 1A). To further analyse the implication of the USF-1 transcription factor in mediating stress response, we examined USF-1 protein 24 hours post cell stimulations (Fig. 1B). The results indicate that MMS treatment over 24h induced the appearance of a 47 kDa USF-1 specific band named M-USF-1 for “Modified USF-1 form”, which was also observed following cell stimulation with Hydroxyurea (2 μ M), Cadmium (5 μ M) and Arsenic (5 μ M). Comparable results were obtained in a dose and time dependant manner, when B16 melanoma cells were treated with hydrogen peroxide. Indeed, H₂O₂ cell stimulation at 10 mM results in the immediate (7 min post stimulation) formation of the 47 kDa USF-1 form, while lower H₂O₂ dose (1 mM) induces the formation of distinct USF-1 forms, of increasing size up to the 47 kDa one after 60min of cell stimulation (Fig. 1C).

M-USF-1 in response to biological stress

Although, USF-1 transcription factor has been involved in virus transcription regulation [17-19], and the p38 signalling pathway is activated following virus infection [20], no direct evidence of USF-1 post-translational modification has yet been reported following biological

injuries. To investigate the possibility that USF-1 was a virus downstream target, we infected CS6269 fibroblastes cells and 501 melanoma cells with distinct lytic virus (Varicella Zoster Virus VZV and Herpes Simplex virus HSV). Results obtained, 24 hours after infecting the CS6269 cells with increasing VZV solution titre, revealed the appearance of the 47 kDa USF-1 band in a dose dependent manner (Fig. 2B). Comparable results were obtained in 501 cells, and following HSV infection (data not shown). We next investigated the possibility that USF-1 was also a downstream target for bacteria contamination. *Mycoplasmas hyorhinnis*, one of the most common strain, that is found to contaminate tissue cultures cells, has been used over a 2 days time course. Immuno-fluoro-staining monitored contamination, of the CS6269 cell lineage. *Mycoplasma* staining was present at low level on day 1, and highly intense on day 2, which correlates with the appearance of the M-USF-1 form (Fig. 2B). Comparable results were obtained with different cell lines (501mel, B16F1, BLM1492...) (data not shown).

M-USF-1 form is mediated by the p38 stress activated kinase

We next considered the possibility that the appearance of the 47 kDa M-USF-1 form was a novel phosphorylated USF-1 form. As USF-1 has been shown to be a downstream target of distinct kinases (p38, Cyclin-cdk1, pKA-pKC, PI3K) [8, 21-23], we used specific inhibitors for each of them (respectively SB203580, Roscovitin, Olomucine, Bisindolylmaleimide, wortmanin) to facilitate the identification of the relevant pathway, if any. We used also additional inhibitors (ZM336372, U0126, Rapamycin) to explore possible role of the Braf-MAPKinase pathway and the P70S6 kinase one. As shown in Figure 3A, 24 hours of MMS stimulation results in the appearance of the M-USF-1 form, which was completely abrogated in the presence of p38 specific inhibitor (SB 203580 10 μ M). Comparable results were obtained following HU and UV inductions (data not shown), and no abrogation of the M-USF-1 form could be observed with neither of each other inhibitors tested (data not shown). Our data suggest strongly that M-USF-1 is indeed a new phosphorylated USF-1 form. However, this experiment can not rule out the possibility that the appearance of the M-USF-1 form do not requires the phosphorylation of the T153 residue, which is p38 dependant. To explore this possibility, we analysed the response of transfected WT and T153A mutant forms of USF-1 following H₂O₂ treatment (1h at 1 mM). Both, WT and mutant USF-1 displayed a 47 kDa band following H₂O₂ treatment, indicating that M-USF-1 modification occurs independently from T153 phosphorylation (Fig. 3B).

Specific *in vivo* interaction of M-USF-1 to DNA

To investigate the possible role of M-USF-1 form, we first checked for the presence of the M-USF-1 protein in the nuclear fraction of a fractionated cell extracts. As M-USF-1 was exclusively present in the nuclear fraction like the USF-1 form (Fig. 4A), we next explored the ability of M-USF-1 to bind DNA, *in vivo*. Chromatine immunoprecipitation (ChIP) assays were performed to analyze the direct interaction of M-USF-1 with distinct promoter-genes that proved to be regulated by USF-1 (*POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CYCLIN B1*, *CDK1*, *hTERT*), upon binding to critical E box motifs (Fig. 4B). 501mel cells treated with MMS (0,2 mM) for 24 hours or not, and were process for chromatin immunoprecipitation protocol using USF-1 specific antibody. [14, 24]. Protein analysis performed on ChIP extracts, confirmed that the M-USF-1 form was exclusively present when cells had been submitted to the MMS compound (Fig. 4D). The interaction of M-USF-1 with *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CYCLIN B1*, *CDK1*, *hTERT* and *HSP70* promoters was thus evaluated by PCR amplification. The results indicate that M-USF-1 interacts specifically with *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CYCLIN B1*, *CDK1*, and *hTERT* promoters which do all posses E-box regulatory elements, while no interaction could be find with *HSP70* promoter, which lack E-box motif. Finally, no interaction was observed in the presence of non specific Ig (Fig. 4C).

M-USF-1 down-regulates gene expression

To investigate further, M-USF-1 transcriptional function, gene expression analysis was performed using real time RT-PCR. RNA, recovered from 24h and 36h MMS (0,2 mM) 501mel treated cells, was subjected to quantitative gene expression analysis. The results obtained for *TYR*, *POMC* and *MC1R* genes indicated a significant decrease of about 3 fold gene expression level, in the presence of M-USF-1 protein, visualized by western blot analysis (Fig. 5A). While 5h and 8h stress inductions had proved to increase significantly gene expression, up to 7-fold in the case of the *POMC* gene, which correlates with the presence of the P-T153-USF-1 form. We next analysed in a single MMS stimulation time course (1h – 3h – 5h – 7h – 24h), *CYCLIN B1*, *CDK1* and *hTERT* genes expression. MMS stimulation results in an up-regulation of gene expressions, reaching ~4 fold activation for *CDK1* and *hTERT* promoters, at the beginning of the time course (3 to 7h), while significant down-regulation of *CYCLIN B1*, *CDK1* and *hTERT* gene expressions (~2 fold), was observed at 24h (Fig. 5B). Up-regulation phase correlates with to the presence of the P-T153-USF-1 form, while the following down-regulation phase corresponds to the presence of the M-USF-1 form. Although, the USF-1 protein is a downstream target of the stress activated p38 kinase,

no modification of USF-1 gene expression could be revealed, over the time. In conclusion, the binding of the M-USF-1 form, onto DNA favours down regulation of target gene expressions, while USF-1 gene expression remained constant over MMS time course stimulation.

Discussion

Although the USF-1 transcription factor plays a major role in gene expression regulation, little is known on USF-1 transcriptional activity in response to increasing environmental stress. In this study we identify a novel stress responsive form of the USF-1 transcription factor named M-USF-1. The appearance of the M-USF-1 form is observed in response to DNA-damage, oxidative stress, heavy metal stimulations and biological infections in a dose and time dependant manner. Like the P-T153-USF-1 form, the M-USF-1 modification is dependant on the stress-activated p38 kinase, strongly suggesting that M-USF-1 is a novel phosphorylated form that displays a distinct apparent MW (47 kDa). Indeed, the use of the specific stress activated p38 inhibitor (SB203585) abrogate the formation of the M-USF-1 modification in response to 24h stress stimulation, while none of the additional inhibitors tested, targeting specific kinases, proved to be efficient.

Although, the P-T153-USF-1 form and the M-USF-1 one seems to appear sequentially as a two steps response towards stress signalling accumulation, the M-USF-1 modification does not require the phosphorylation of the T153 residue and can be induced immediately in the presence of high dose of oxidative compound (H₂O₂: 10 mM). This could explain why cell lines presenting genetic instability with DNA-repair deficiency (Bloom and Cockayne syndromes) display more rapidly high level of M-USF-1 form in response to stress. Genetic instability would thus favour an immediate response due to the presence of constitutively activated stress signalling pathways. This observation has been confirmed with cell lines presenting other instability disorders including Werner syndrome, Rothmund-Thomson syndrome, Fanconie Anemia and Xeroderma Pigmentosum (XP-G and XP-V) defects (data not shown).

Using a Chromatin Immuno-Precipitation approach, we were able to establish that M-USF-1 interacts with specific E-box containing promoter genes, consistent with its nuclear localization. However, M-USF-1 form displayed distinct transcriptional activity compared to the P-T153-USF-1 one. Real time PCR analysis, quantifying endogenous mRNA level of USF-1 target genes, indicates that while P-T153-USF-1 induces increase transcription-level of genes implicated in the pigmentation pathway (*POMC*, *MC1R*, *TYR*) [14, 15] and cell cycle regulation (*CYCLIN B1*, *CDK1*, *hTERT*) [11, 25], the appearance of the M-USF-1 form, 24h

post stress stimulation correlates, with down-regulation of those genes. In addition, although USF-1 transcription factor presents post-translational modification over the time, no variation of *USF-1* gene expression does occur.

Loss of M-USF-1 transcriptional activity can possibly be due to distinct mechanisms. Among them, we can hypothesize that M-USF-1 modification does alter the transcriptional activity domain itself, or that M-USF-1 form displays new protein-protein interaction features. Indeed, transcriptional active USF-1 protein is known to interact with members of the Pre-initiation complex (TFIID, TAFs) [26], and specific transcription factor (SP1, MTF1) leading to cooperative transcriptional up-regulation [27, 28]. In addition, USF-1 mediates the recruitment of enzymes (PCAF, SET7/92) that modify Histones, allowing chromatin remodelling and opening, promoting DNA loading of the transcription machinery and transcription activation [29]. Loss of those specific interactions, concomitantly to possible new protein-protein interaction, with transcription inhibitors or HDAC, would diminish gene transcription. These hypotheses are consistent with the observation that recombinant USF-1 protein lacks transcriptional activity in Saos-2 cell, while recombinant USF-1 remains active in HeLa cells, indicating that USF-1 activity is regulated and dependent on cell context [30]. Again, loss of USF-1 transcriptional activity was reported in breast cancer cell lines, while normal human mammary epithelial cells displayed transcriptional activity [31].

Gene expression is a tightly regulated process, which integrates cellular and environmental signals, leading to sequential up-regulation and down-regulation events. In this context the USF-1 transcription factor is a key sensor of stress signalling. Indeed, the USF-1 modification forms do appear in response to various stimuli, including Cadmium and Arsenic Heavy metals stimulation; oxidative stress; DNA-damage, allowing regulation of specific related target genes, respectively *metallothionein*; *COX2*; *HO1* and *glutamate-cysteine ligase*; *TP53* and *BRCA2* genes [28, 32-36]. Similarly, USF-1 protein is modified upon virus infection and viral genes are direct USF-1 targets [37]. Which suggests that stress USF-1 induced-forms participate in regulation loops: comprised of a first positive one, followed by a second negative one, when stress is above a critical threshold. Indeed, in normal cells, low levels of stress, compatible with life, result in positive gene expression regulations as cell cycle control; while excess of stress, would alter cell cycle regulation (Fig. 6), favouring uncontrolled proliferation in malignant cells.

Finally, the identification of this new USF-1 modification form in response to critical level of stress, with specific gene-expression down-regulation properties, highlight the dual function of the USF-1 transcription factor, giving new insight in USF-1 target gene networks

regulation in regards to environmental cell conditions, including DNA-damage and cancer development. Indeed, tumour cells progressions are reported to present abnormal level of oxidative stress [38-41].

Materials and methods

Cell culture

501mel human melanoma and B16 murin melanoma cell lines (obtained from the ATCC, Rockville, MD, USA) were maintained in RPMI-1640 medium (Cat N°21875-034, Gibco BRL, Invitrogen), supplemented with 5% Fetal Calf Serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Gibco BRL, Invitrogen), in a controlled atmosphere (10% CO₂). BLM 1492 and CS6269 human fibroblasts, isolated respectively from patients that displayed Bloom and Cockaine syndrome (Coriell Institute for medical research, Camden, NJ, USA) were maintained in DMEM medium (Cat N°41966-029, Gibco BRL, Invitrogen) supplemented with 5% FCS and 1% penicillin-streptomycin antibiotics in a controlled atmosphere (5% CO₂).

Cell stimulation

DNA-damage stresses were obtained using ultra-violet light (UVB 312 nm, 80 mJ/cm²), methyl methane sulfonate (MMS: 0,2 mM and 1 mM), and hydroxyurea (HU: 2 µM). Oxidative stress was performed with hydrogen peroxide (H₂O₂: 1 mM and 10 mM) and menadione (0,1 µM). Heavy metal stress was obtained with Cadmium (5 µM) and Arsenic (5 µM). Briefly, cells were plated at 50-70% confluence, depending on their doubling time, in 10 and 3.5 cm diameter Petri dishes for RNA and protein preparation respectively, such that they reached 80% confluence at the harvesting time. 12 h previous stress-induction, the 5% FCS medium was replaced with medium containing only 1% FCS. Chemical inductions were then obtained by adding specific compounds directly into the medium. UVB induction was performed as previously described [14].

When required, cells were pre-treated with specific inhibitors of the p38 kinase (10 µM SB203580), the MAP kinase (10 µM U0126), the Cyclin A2/B1-cdk1 (10 µM Roscovitin and 10 µM Olomucine), the PI3K (200 nM Wortmanin), the Braf protein (1 µM ZM336372), the p70 S6 kinase (1 nM Rapamycin), and the PKA-PKC (100 nM BisIndolylmaleimide) for 1h prior to stimulation. Stimulated monolayer cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), harvested by scraping and then centrifuged at a low speed. Cell pellets were resuspended in either 300 µl of lysis buffer (Nucleospin[®] RNA II extraction kit, Macherey-

Nagel) solution for immediate mRNA extraction, and storage at -80°C until use, or resuspended in Laemmli buffer for Western blotting analysis.

Viruses and mycoplasma infection

VSV and HSV-1 strain F (a kind gift of A.Ruffaud) were amplified *in vitro* using Vero cells. Their respective titres, estimated by plaque essays with Vero cells, were 5.10^6 and $0,25.10^8$ plaque forming units per ml (pfu/ml). Infections were performed in CS6269 fibroblastes and 501mel cells with gradual dilutions of virus solutions. 24 hours post-infections, cells were recovered for Western blotting protein analysis.

The Mycoplasma strain was isolated from the supernatant of a contaminated cell line. Sequence analysis of the Mycoplasma 16S ribosomal gene using the following Forward and Reverse primers (16S-F1: 5'-agtggcgaacgggtgagtaac-3', 16S-R1: 5'-actgctgcctcccgtaggag-3'; 16S-F2: 5'-taatgccagcagccgcg-3', 16S-R2: 5'-gctaccacgctttcgaagtg-3') lead to the identification of the strain : Mycoplasma hyorhhis. Contamination of CS6269, BLM1492 and 501mel cells, were monitored by immunoflorecent staining using Hoechst solution, included in DAPI Mounting medium (Vectashield[®], Vector), according to manufacturer instructions. Contaminated cells were recovered also for Western blotting protein analysis.

Transient transfection assays

501mel cells were plated in 5% SVF supplemented medium in 6 well plates and allowed to grow overnight to 80% confluence. Transfections were performed using Fugene reagent (Roche), according to the manufacturer's instructions using 1 μg of plasmid DNA (WT pCMV-USF-1; or T153A mutant, [15]). 48 hours post-transfection, cells were or not induced with 1mM H_2O_2 , for one hour. Harvested cells were resuspended in Laemmli buffer for Western blotting protein analysis.

Western blots

Whole cell lysates were resolved by 10% SDS-PAGE, using a 200:1 acrylamide: bis-acrylamide ratio. Following blotting, membranes were probed with appropriate primary antibodies and positive signals detected using peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies, visualized by ECL Super Signal Detection Kit (Pierce).

The primary antibodies used were the polyclonal anti-USF-1 Ab (USF-C20, Santa Cruz Biotechnology), the monoclonal anti-tubulin Ab (Sigma), the polyclonal anti-P-p38 Ab (#9211, Cell Signaling), and the monoclonal anti-SV5 flag Ab (Sigma).

ChIP

Chromatin immunoprecipitation assays were performed in CS6268 and 501 mel cell lines essentially as described previously [14, 24] using 10 µl of specific antibody (USF-1 Ab, Santa Cruz Biotechnologies) or non-specific IgG (anti-rabbit Ab, Amersham Biosciences). The recovered DNA was subjected to PCR.

The primers used to amplify the human promoters of *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CYCLIN B1*, *CDK1*, *HTERT*, *TP53* and *HSP70* genes were as follows (F: forward, R: reverse):

POMC-F: 5'-gaccaacgccatcataat-3';	POMC-R: 5'-ggagagacgcgctggaaa-3';
MC1R-F: 5'-cgcgcatgtgccaactcctg-3';	MC1R-R: 5'-gtcgtctcagagcccctcc-3';
TYR-F: 5'-gtggatacagagccaattcga-3';	TYR-R: 5'-cctctagtctcacaaggtctgca-3';
CYCLIN B1-F: 5'-ggcactaggccttcctga-3';	CYCLIN B1-R: 5'-tcgcagagaatgcgtttcc-3';
CDK1-F: 5'-ctagatcccatgtcaaaaactg-3';	CDK1-R: 5'-cagtgccatttgccagaaa-3';
HTERT-F: 5'-tccgagtgctcctgagtatg-3';	HTERT-R: 5'-ggccgcatctgaacaaa-3';
HSP70-F: 5'-aatcccagaagaactctggagagt-3';	HSP70-R: 5'-ggctttataagtcgtcacggag-3'.

RNA Extraction cDNA Synthesis and Expression analysis

RNA was extracted by using the Nucleospin[®] RNA II extraction kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's instruction. A RQ-Dnase (Promega) treatment within the column was performed before eluting the RNA to ensure the absence of genomic DNA. Recovered RNA was quantified using the Nanodrop device (Nanodrop Technology). Reverse transcription reactions were carried out using the M-MuLV enzyme (#M0253S, Ozyme[®]) according to manufacturer's specific recommendations, with 1 µg of total RNA and 300 ng of random primer (#48190-011, Invitrogen[®]). Real-time PCR was carried out in sealed 96-well microtiter plates using the SYBR[™] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]). Gene expression was analyzed using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems[®]) and the results were evaluated using the associated software (version 1.2.3, Applied Biosystems[®]). The 18S ribosomal RNA subunit, the values of which remain constant over 24 hours, was used as an internal positive control. The relative amounts of transcripts were determined using the Ct method as described by the manufacturer. The mRNA levels at each time point following stimulation are expressed as a fold increase compared with non-stimulated control cells. Each experiment was carried out at least twice and each time point was done in duplicate.

Forward (F) and reverse (R) primers were designed using the Primer Express[™] software (version 2.0-PE Applied Biosystems[®]) and have been previously tested for their efficiencies (data not shown). The human primers used for real-time PCR for the *POMC*, *MC1R*, *TYR*,

CYCLIN B1, *CDK1*, *HTERT*, *USF1* and *18S* genes were as follows:

POMC-F: 5'-gaccaaacgcatcataat-3';	POMC-R: 5'-ggagagacgcgctggaaa-3';
MC1R-F: 5'-cgcgcgatgtgccaaactcctg-3';	MC1R-R: 5'-gtcgttctcagagccctcc-3';
TYR-F: 5'-gtgggatacagagccaattcga-3';	TYR-R: 5'-cctctagtctcacaaggtctgca-3';
CYCLIN B1-F: 5'-ggccactagcctttctga-3';	CYCLIN B1-R: 5'-tcgcagagaatgcgtttcc-3';
CDK1-F: 5'-ctagatcccatgtcaaaaacttg-3';	CDK1-R: 5'-cagtgccattttgccagaaa-3';
HTERT-F: 5'-tccgaggtgtccctgagatg-3';	HTERT-R: 5'-ggccggcatctgaacaaa-3';
USF1-F: 5'-accctattccccgaagtcaga-3';	USF1-R: 5'-cgacgtccacttcattatg-3';
18S-F: 5'-cctagcaatggtctggacaa-3';	18S-R: 5'-tctatgggccgaatcttctt-3'.

Acknowledgments

This work was supported by “Ligue National contre le Cancer”, the “Association pour la Recherche contre le Cancer, ARC” foundations; and the Marie Curie Cancer care.

References

1. Henrion, A.A., et al., *Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse*. Genomics, 1995. **25**(1): p. 36-43.
2. Groenen, P.M., et al., *Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia*. Genomics, 1996. **38**(2): p. 141-8.
3. Corre, S. and M.D. Galibert, *Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors*. Pigment Cell Res, 2005. **18**(5): p. 337-48.
4. Sirito, M., et al., *Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers*. Gene Expr, 1992. **2**(3): p. 231-40.
5. Sirito, M., et al., *Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(3): p. 427-33.
6. Lin, Q., X. Luo, and M. Sawadogo, *Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF*. J Biol Chem, 1994. **269**(39): p. 23894-903.
7. Sirito, M., et al., *Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3758-63.
8. Galibert, M.D., et al., *Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 6176-83.
9. Roth, U., K. Jungermann, and T. Kietzmann, *Modulation of glucokinase expression by hypoxia-inducible factor 1 and upstream stimulatory factor 2 in primary rat hepatocytes*. Biol Chem, 2004. **385**(3-4): p. 239-47.
10. Pawar, S.A., et al., *Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc*. Oncogene, 2004. **23**(36): p. 6125-35.
11. North, S., et al., *Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs)*. Oncogene, 1999. **18**(11): p. 1945-55.
12. Goueli, B.S. and R. Janknecht, *Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 8042-7.
13. Kingsley-Kallesen, M.L., D. Kelly, and A. Rizzino, *Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta2 promoter by cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and activating transcription factor-1 (ATF-1) is modulated by protein*

- kinases and the coactivators p300 and CREB-binding protein.* J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34020-8.
14. Corre, S., et al., *UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38 activated upstream stimulating factor-1 (USF-1).* J Biol Chem, 2004.
 15. Galibert, M.D., S. Carreira, and C.R. Goding, *The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression.* Embo J, 2001. **20**(17): p. 5022-31.
 16. Schwahn, D.J., et al., *Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation.* Pigment Cell Res, 2001. **14**(1): p. 32-9.
 17. Kenny, J.J., et al., *Upstream stimulatory factor family binds to the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter.* Virology, 1997. **230**(2): p. 381-91.
 18. Calomme, C., et al., *Upstream stimulatory factors binding to an E box motif in the R region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates viral gene expression.* J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8775-89.
 19. Gregor, P.D., M. Sawadogo, and R.G. Roeder, *The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer.* Genes Dev, 1990. **4**(10): p. 1730-40.
 20. Zachos, G., B. Clements, and J. Conner, *Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1.* J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5097-103.
 21. Cheung, E., et al., *DNA-binding activity of the transcription factor upstream stimulatory factor 1 (USF-1) is regulated by cyclin-dependent phosphorylation.* Biochem J, 1999. **344 Pt 1**: p. 145-52.
 22. Xiao, Q., A. Kenessey, and K. Ojamaa, *Role of USF1 phosphorylation on cardiac alpha-myosin heavy chain promoter activity.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(1): p. H213-9.
 23. Nowak, M., et al., *Insulin-Mediated Down-Regulation of Apolipoprotein A5 Gene Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway: Role of Upstream Stimulatory Factor.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1537-48.
 24. Braunstein, M., et al., *Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation.* Genes Dev, 1993. **7**(4): p. 592-604.
 25. Cogswell, J.P., et al., *Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2782-90.
 26. Chiang, C.M. and R.G. Roeder, *Cloning of an intrinsic human TFIIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators.* Science, 1995. **267**(5197): p. 531-6.
 27. Liu, M., et al., *Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter.* Biochem J, 2004. **383**(Pt 2): p. 249-57.
 28. Andrews, G.K., *Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions.* Biochem Pharmacol, 2000. **59**(1): p. 95-104.
 29. West, A.G., et al., *Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element.* Mol Cell, 2004. **16**(3): p. 453-63.
 30. Qyang, Y., et al., *Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1508-17.
 31. Ismail, P.M., T. Lu, and M. Sawadogo, *Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines.* Oncogene, 1999. **18**(40): p. 5582-91.

32. Wu, Y.L. and M.C. Wiltbank, *Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene changes from protein kinase (PK) A- to PKC-dependence after luteinization of granulosa cells*. Biol Reprod, 2002. **66**(5): p. 1505-14.
33. Hock, T.D., H.S. Nick, and A. Agarwal, *Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2, bind to the human haem oxygenase-1 proximal promoter in vivo and regulate its transcription*. Biochem J, 2004. **383**(Pt 2): p. 209-18.
34. Cheng, L.L., et al., *Identification of an E-box motif as a transcriptional repressor element in the proximal promoter region of the GCLC gene in rat lung epithelial L2 cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(8): p. 1030-40.
35. Reisman, D. and V. Rotter, *The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(2): p. 345-50.
36. Davis, P.L., et al., *Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter*. Oncogene, 1999. **18**(44): p. 6000-12.
37. Maekawa, T., et al., *USF-related transcription factor, HIV-TF1, stimulates transcription of human immunodeficiency virus-1*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(17): p. 4689-94.
38. Deininger, M.H., et al., *Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression*. Brain Res, 2000. **882**(1-2): p. 1-8.
39. Takahashi, K., et al., *Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by interferon-gamma in human glioblastoma cells*. J Neurochem, 1999. **72**(6): p. 2356-61.
40. Meyskens, F.L., Jr., P. Farmer, and J.P. Fruehauf, *Redox regulation in human melanocytes and melanoma*. Pigment Cell Res, 2001. **14**(3): p. 148-54.
41. Meyskens, F.L., Jr., et al., *Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(6): p. 799-808.

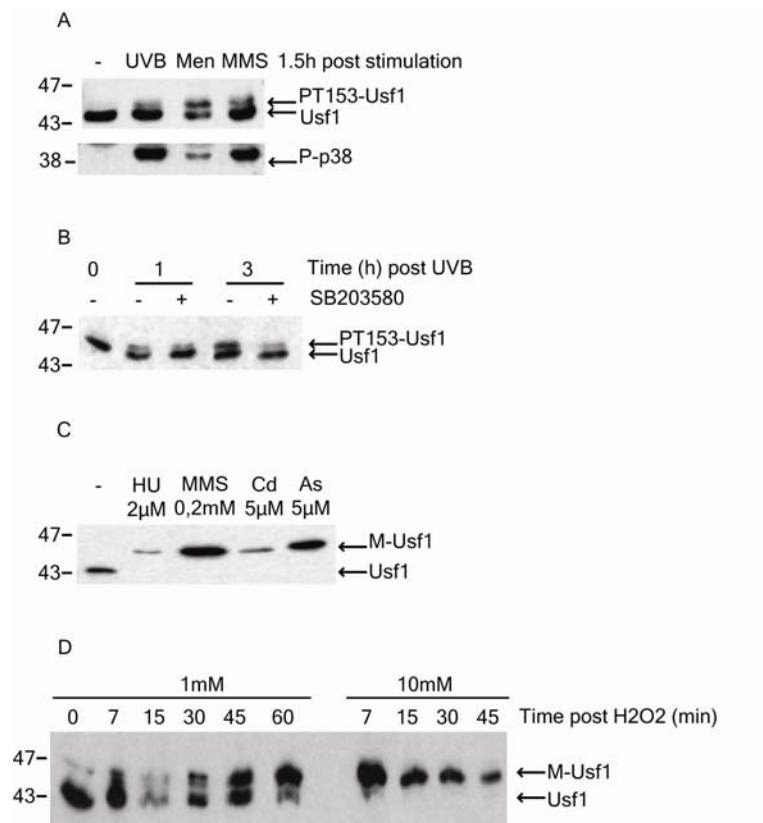


Figure 1 : Identification of a new USF-1 stress-responsive form

A : Western blotting analysis using anti-USF-1 Ab (Santa Cruz) and P-p38 Ab (Cell Signaling) of 501mel cells, before and after UVB irradiation (312 nm 80 mJ/cm²) in the presence or not of the p38 specific kinase inhibitor (SB203580), Methyl Methane Sulfonate (MMS: 1 mM) and Menadione (0,1 μM) stimulations. The 44/45 kDa band corresponds to the phosphorylation of the T153-USF-1 residue (P-T153 form) described previously [8], which is observed 1.5 hours post stimulation. Comparable results were obtained with B16 cells.

B : 24 hours post 501-mel cell stimulations with DNA-damaging compounds (Hydroxyurea, HU: 2 μM, Methyl Methane Sulfonate, MMS: 0,2 mM) and heavy metal compounds (Cadmium, Cd: 5 μM; Arsenic, As: 5 μM), appears a 47 kDa band corresponding to a new USF-1 form named M-USF-1.

C : A time course induction of M-USF-1 formation is obtained in B16 cell line, in response to hydrogen peroxide (H₂O₂) stimulation used at 1 mM and 10 mM. Comparable results were obtained with 501mel cells.

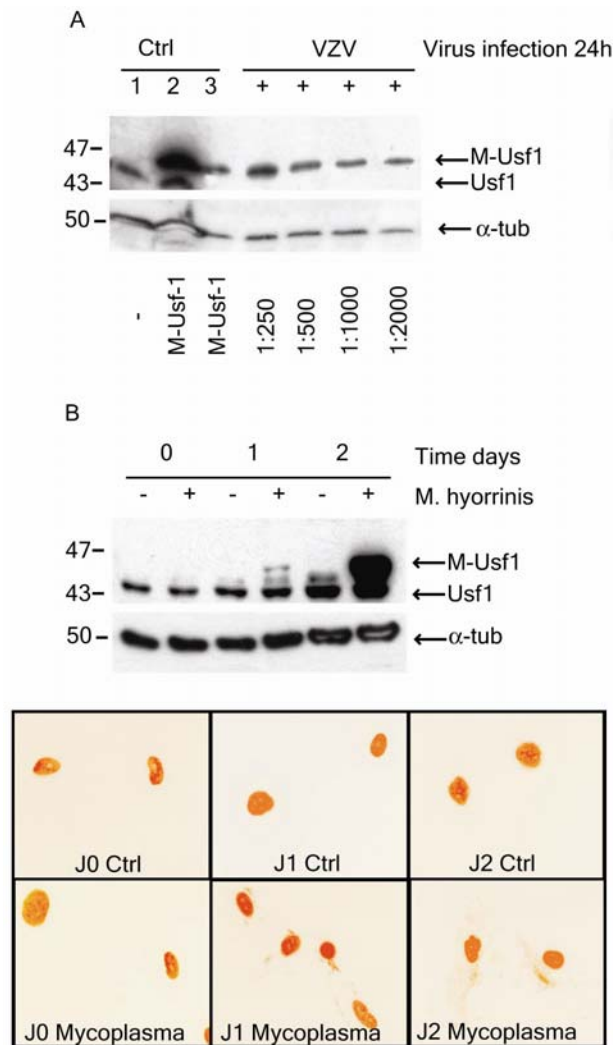


Figure 2 : Induction of the M-USF-1 form after biological stresses

A : CS6269 cells were infected with Varicella Zoster Virus (VZV) using gradual dilutions (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000) of a virus stock titrated at 5.10^6 plaque forming units per ml (pfu/ml). 24 hours post-infection cells were recovered and Western blotting analysed using USF-1 Ab. α -tubulin Ab is used as a loading control and lanes 1 to 3 for USF-1 and M-USF-1, molecular size controls. Comparable results were obtained with 501mel cells.

B : A time course induction of M-USF-1 formation is obtained following Mycoplasma hyorhinis contamination of BLM1492 cells. Mycoplasma contamination level is monitored by immunofluorescence using Hoechst staining. Comparable results were obtained with CS6269, 501mel and B16 cell lines.

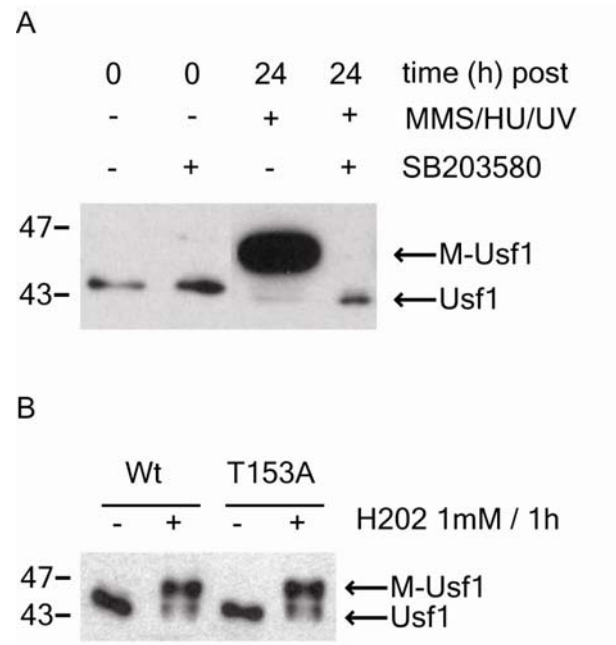


Figure 3 : M-USF-1 is dependent on the p38 kinase pathway

A : Stress-induced M-USF-1 form is abolished, only when 501mel cells are pre-treated with the p38 specific kinase inhibitor (SB 203580 10 μ M) 1 hour prior MMS (0,2 mM), HU (2 μ M) or UVB (80 mJ/cm²) stimulations.

B : Appearance of the M-USF-1 form is not dependant on the phosphorylation of T153 residue. WT recombinant USF-1 protein (WT pCMV-USF-1) and T153A-USF-1 mutant protein (T153A pCMV-USF-1), expressed in 501mel cells, are both modified following H₂O₂ treatment (1 mM – 1h).

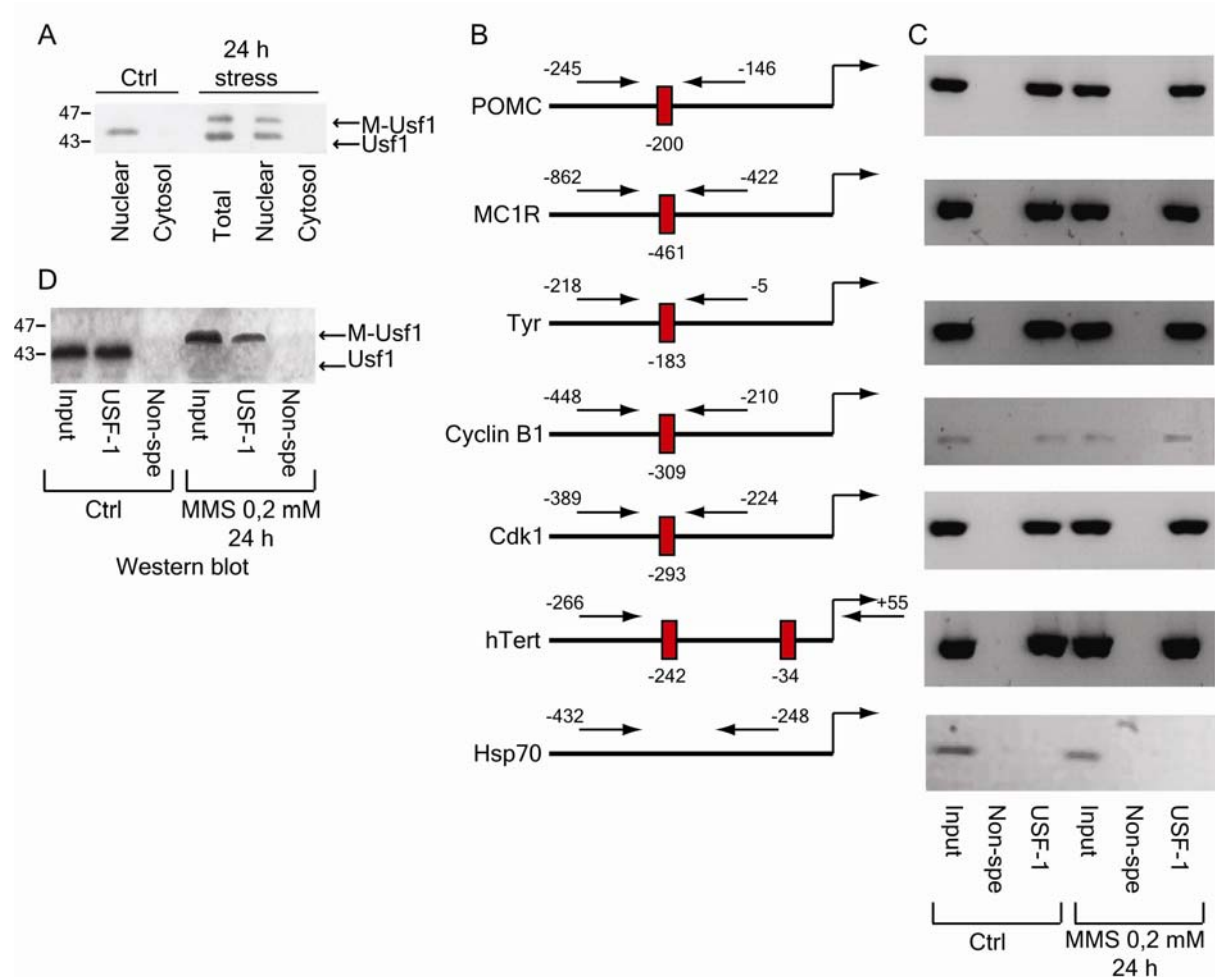


Figure 4 : M-USF-1 interacts in vivo with DNA

A : Western blotting analysis of fractionated cell extract, obtained 24h after stress stimulation (MMS or Menadione), indicate that M-USF-1 localize in the nucleus, like the non modified USF-1 form.

B : Schematic representation of human *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CYCLIN B1*, *CDK1*, *hTERT* and *HSP70* promoters. E-box motifs are shown in red (■). Positions of PCR primers (→←) used for chromatin immunoprecipitation assays are shown relative to the start sites of each promoters, and are centred on each E-box motif, except for *HSP70* primers.

C : Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) assays were performed on 501mel cells, which were stimulated or not with MMS (0,2 mM – 24h), using anti-USF-1 antibody or non-specific IgG. Recoverd DNA was subjected to PCR using primers specific for each promoters (B). Specific primers for Hsp70 were used as negative control.

D : Western blot analysis was performed on ChIP extract to confirm that M-USF-1 was exclusively present in MMS treated cells.

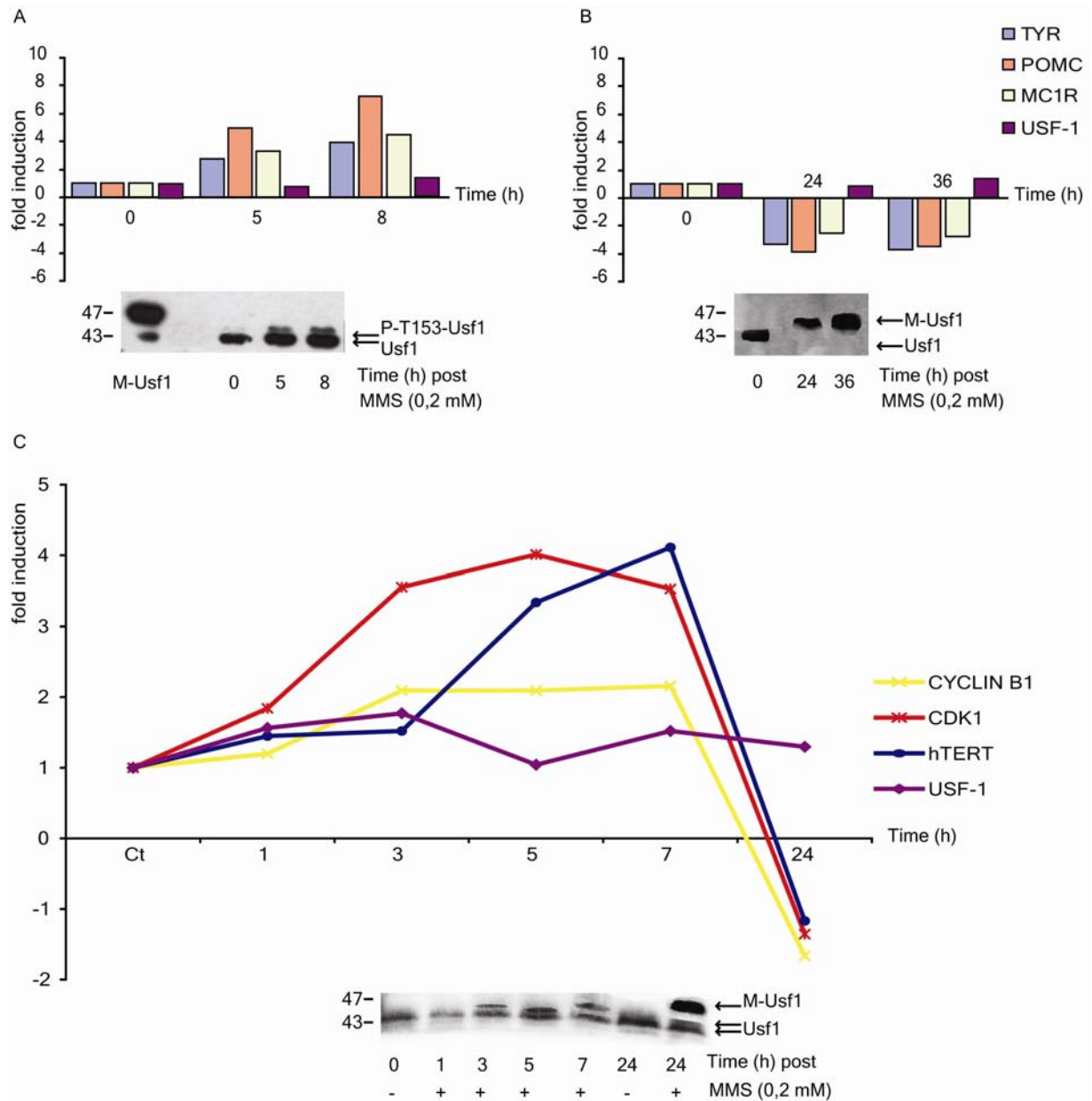


Figure 5 : USF-1 target genes are downregulated in the presence of the M-USF-1 form

Expression level of USF-1 target genes were analysed under specific stress conditions, using real time PCR.

A *POMC*, *MC1R* and *TYR* gene expressions and USF-1 protein content were analyzed in 501mel cells before and after UVB irradiation (312 nm – 80 mJ/cm²). Significant gene induction was observed since 5h, in the presence of the P-T153-USF-1 form, as indicated by Western blot protein analysis.

B Similarly, *POMC*, *MC1R* and *TYR* gene expressions, and USF-1 protein content were analyzed in 501mel cells before and after MMS stimulation (0,2 mM). Significant gene inhibition was observed at 24 and 36h post cell treatment, in the presence of the M-USF-1 form.

C Gene expression analysis of *CYCLIN B1*, *CDK1*, and *HTERT* were performed in 501mel cell before and after MMS treatment (0,2 mM) at the following time points (1h – 3h – 5h – 7h – 24h). Up-regulation (3h-7h) and down-regulation (24h) of gene expressions were correlated respectively with the presence of the P-T153-USF1 form (3h-7h), and the M-USF-1 form (24h).

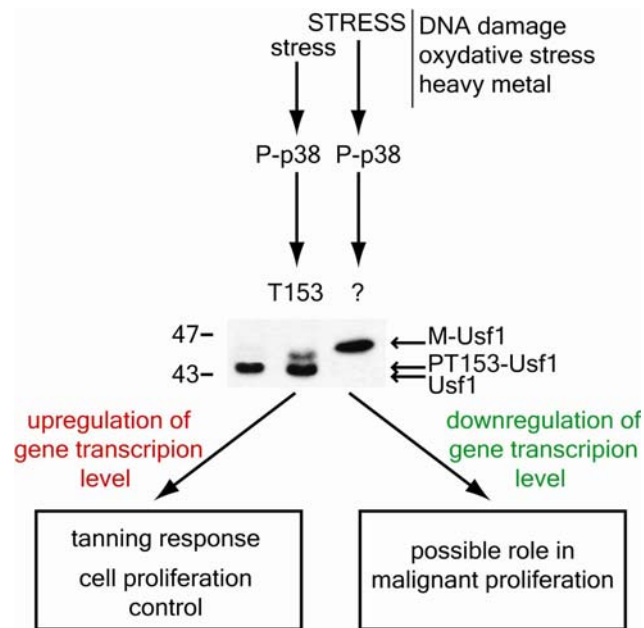


Figure 6: USF-1 gene expression regulation model

Following, low levels of stress (**stress**), the USF-1 transcription factor is activated (P-T153-USF-1) leading to the up-regulation of USF target gene networks allowing the tanning response, cell cycle and proliferation control. When stress is above a critical threshold (**STRESS**), the USF-1 transcription factor is modified by the p38 stress activated kinase, leading to the appearance of a 47 kDa form (M-USF-1), which down-regulates gene expression level. Suggesting new possible regulation process in tumour cells, characterized by abnormal level of oxidative stress.

Les différents articles présentés se sont intéressés à deux sujets principaux, à savoir le rôle du facteur de transcription USF-1 et les mécanismes de régulation de l'expression des gènes au cours de la pigmentation photo-induite. Le facteur USF-1 a en effet un intérêt tout particulier dans la régulation de l'expression génétique, avec une spécificité d'action bien précise, dictée par la présence de motifs de liaison au niveau des promoteurs, par des modifications post-traductionnelles de la protéine, et également par l'environnement cellulaire.

1> La complémentation fonctionnelle des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription de la famille des Upstream Stimulating Factor (USF-1 et -2), appartenant à la famille des bHLH-LZ au même titre que les facteurs Mitf, Max, Mad, Myc, TFE jouent un rôle primordial au niveau de la régulation des processus cellulaires. Le double KO d'USF-1 et -2 conduit à un phénotype létal chez la souris, au contraire du simple KO de l'un des deux gènes. Ces deux facteurs de transcription ne sont pas essentiels pour la survie cellulaire, et malgré des fonctions cellulaires divergentes, vont être capables de se substituer de manière plus ou moins efficace et selon le contexte cellulaire pour la régulation de l'expression génétique.

L'intérêt de posséder dans la cellule un ensemble de facteurs de transcription, qui montre des modalités d'activation de la transcription proches (USF-1, USF-2, Mitf...), va permettre de réguler très précisément et de manière spécifique l'expression des gènes. Selon la concentration des différents protagonistes de la transcription, et selon l'environnement nucléotidique du motif consensus de liaison, plus ou moins favorable pour la fixation, les gènes vont être régulés de manière différentielle. C'est cette diversité qui va par exemple permettre d'expliquer pourquoi, le facteur de transcription Mitf va plutôt agir dans les mélanocytes au niveau de la pigmentation constitutive, alors que le facteur de transcription USF-1 va intervenir de manière préférentielle dans la pigmentation photo-induite. Dans le but de distinguer le rôle respectif d'USF-1 et de Mitf au niveau de la transcription des gènes, une étude préliminaire, qui reste à confirmer, consistait à rechercher les gènes cibles respectifs des facteurs de transcription (données non présentées). Pour cela, nous avons envisagé une approche de transfection transitoire des facteurs de transcription dans des lignées mélanocytaires n'exprimant pas les protéines USF-1 et Mitf. Par la suite, une analyse transcriptomique par utilisation de la technique des puces à ADN, nous a permis de déterminer quels sont les gènes cibles régulés de manière spécifique par USF-1, ou par Mitf.

Les résultats obtenus montraient que les deux facteurs de transcription régulent de manière identique un certain nombre de gènes, mais ont également une activité transcriptionnelle bien spécifique. Ces résultats permettent de se rendre compte de la complexité de fonctions des facteurs de transcription, et de la spécificité de régulation de l'expression des gènes cibles.

2> *Identification des gènes cibles d'USF*

Les facteurs de transcription USF régulent de manière identique et conjointe l'expression de nombreux gènes impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires. Par exemple, les facteurs USF impliqués dans le contrôle du métabolisme du sucre, vont induire de manière identique l'expression des gènes codant l'insuline, l'IGF-BP, le récepteur au glucagon, l'IGRP, la glucokinase, la L-pyruvate kinase ; et vont ainsi globalement favoriser la dégradation du glucose par la cellule. Les facteurs USF agissent de manière similaire dans le métabolisme des lipides. Au niveau de leur implication dans la réponse immunitaire, les facteurs USF induisent encore l'expression de différents gènes relatifs à la synthèse des immunoglobulines pour favoriser la réponse immunitaire humorale. USF-1 régule l'expression des gènes *CYCLIN B1* et *CDK1*, or USF-1 est également activé par phosphorylation par Cdk1. Ce mécanisme de régulation intervient donc pour favoriser de manière d'autant plus importante la transition G2/M du cycle cellulaire. Enfin, USF-1 après activation par phosphorylation par la kinase p38, régule à la fois l'expression du gène *TYR* (Galibert, Carreira et al. 2001) et des gènes *POMC* et *MC1R* (Corre, Primot et al. 2004) pour augmenter la synthèse de mélanine suite à une irradiation par les rayonnements ultraviolets. Ainsi, l'induction de l'expression des différents gènes de la pigmentation en réponse aux UV, permet d'amplifier rapidement et efficacement la pigmentation pour permettre la protection de la peau. Du fait de la très grande représentativité et du caractère partiellement dégénéré des motifs consensus (CANNTG) dans l'ensemble du génome, les facteurs de transcription USF sont probablement impliqués dans la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes. L'un des objectifs pour identifier les rôles du facteur USF-1, est de déterminer les cibles génétiques du facteur de transcription. La technologie des puces à ADN semble la plus appropriée pour identifier rapidement les gènes qui sont régulés par USF-1. En couplant les résultats obtenus avec les données de CHIP-CHIP (immunoprécipitation de chromatine combinée avec les puces à ADN), il est alors possible de savoir si les gènes régulés par USF-1, le sont de manière directe après liaison au promoteur ou de manière indirecte *via* l'activation de voies intracellulaires.

3> Redondance des voies intracellulaires d'activation de la mélanogénèse

L'activation de la pigmentation *via* la régulation de l'expression des gènes de la pigmentation implique différentes voies cellulaires et transcriptionnelles, qui ont des fonctions redondantes et qui aboutissent à une augmentation globale de la synthèse de mélanine. L'activation UV-dépendante de la mélanogénèse n'est pas seulement médiée par la voie PKA, mais la stimulation de la voie PKC par le 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol après UV est également capable de favoriser la pigmentation (Carsberg, Wärenius et al. 1994).

La redondance apparaît aussi au niveau du rôle des facteurs paracrines libérés par les kératinocytes (EDN1, FGF2, α -MSH), qui vont activer les mêmes voies cellulaires (Imokawa, Kobayashi et al. 1997; Imokawa 2004). L'expression de ces facteurs est induite par les UV, et conduit à l'augmentation de leur quantité. Ceci va conduire à l'activation finale de la pigmentation et de la synthèse d'eumélanine protectrice. L'endothéline 1 et le FGF2 sont capables d'activer la voie de la kinase p38 et vont permettre d'activer les facteurs de transcription USF-1 (Galibert, Carreira et al. 2001) et Mitf (Mansky, Sankar et al. 2002) qui vont alors agir sur l'expression à la fois des gènes *TYR*, *TRP1*, *DCT*, mais aussi des gènes *POMC* et *MC1R*. Ces données nous montrent qu'il existe différentes voies de signalisation qui aboutissent à la même induction finale de l'expression de *POMC* et de *MC1R* en réponse aux UV. Les nombreuses boucles d'amplification permettent d'amplifier la réponse pour aboutir à une stimulation efficace et rapide de la mélanogénèse en réponse aux UV.

Enfin, du fait du caractère ubiquitaire et de la redondance des boîtes E sur l'ensemble du génome, il est tout à fait imaginable que d'autres gènes de la pigmentation possèdent au sein de leur promoteur de tels motifs consensus qui pourraient être des sites de liaisons potentielles pour une activation transcriptionnelle par le facteur USF-1, suite à une irradiation par les UV. Ainsi, l'induction générale de l'expression des différents gènes de la pigmentation après irradiation par les UV, permettrait d'amplifier de manière globale la mélanogénèse, ainsi que le transfert du pigment pour une protection efficace et rapide de l'épiderme contre les rayonnements ultraviolets. Cette hypothèse est d'autant plus confortée par le fait que le facteur de transcription Mitf, appartenant à la même famille qu'USF-1 et se liant à l'ADN au niveau de motifs similaires, a été impliqué dans la régulation de nombreux gènes participant à la pigmentation constitutive (*TYR*, *TRP1*, *DCT*, *MC1R*, *SLUG*, *SILV*, *KIT*, *MATP*, *OAI*) (cf. § Le rôle du facteur de transcription Mitf, page 52).

4> Intérêt d'un modèle intégratif *in vivo* pour l'étude de la pigmentation UV-induite

Les résultats obtenus pour la régulation UV dépendante de l'expression des gènes de la pigmentation ont été dans un premier temps obtenus sur des lignées cellulaires d'un seul type, qui ne tiennent pas compte de l'importance de la coopération entre les différents types cellulaires de l'épiderme (kératinocytes et mélanocytes), qui est essentielle pour une réponse efficace. Le modèle utilisé dans notre étude prend en compte ces interactions, et correspond à la situation physiologique de l'épiderme. Ces modèles *in vivo* et *ex vivo* permettent en plus d'étudier d'autres mécanismes cellulaires qui interviennent rapidement au niveau des cellules de l'épiderme en réponse aux rayonnements ultraviolets (l'inflammation, la réponse immunitaire, ou encore la survie cellulaire et l'apoptose). Ils peuvent également être utilisés dans le but de déterminer les mécanismes moléculaires et génétiques qui sont impliqués dans ces différents processus (Brink, Szamel et al. 2000; Beattie, Finlan et al. 2005). Cependant, le modèle *in vivo* ne permet pas d'études à grande échelle, dans la mesure où elle reste tributaire des patients et de la chirurgie, et est donc limitée par le nombre d'échantillons analysables, même si cet inconvénient est partiellement contourné par l'utilisation des explants de peau.

La recherche en Dermato-Cosmétologie investit chaque jour des sommes considérables pour l'identification et la caractérisation de nouvelles molécules qui ont un rôle au niveau de la peau en terme de protection solaire, d'agents dépigmentants, d'anti-vieillessement, d'anti-inflammatoire... Les explants de peau peuvent être utilisés *ex vivo* de différentes manières pour l'analyse des effets moléculaires d'un grand nombre de composés. Il est par exemple possible de tester l'effet de molécules photoprotectrices sur l'épiderme par comparaison à des zones non irradiées. Il est aussi envisageable de tester les effets secondaires de certains médicaments au niveau de la peau et ainsi de déterminer quels sont les mécanismes qui sont déclenchés par la substance active.

5> Rôle de la nouvelle forme d'USF-1 dans le mélanome

Dans la dernière partie de la thèse, nous avons mis en évidence pour la première fois une nouvelle forme post-traductionnelle du facteur de transcription USF-1, en réponse à un stress cellulaire (chimique, biologique ou physique). L'identification de cette nouvelle forme est importante pour la compréhension du mécanisme d'action d'USF-1 et ouvre de nouvelles perspectives quant à son rôle dans la régulation des processus cellulaires et à son éventuelle

implication dans les mécanismes de cancérisation cutanée. L'activité transcriptionnelle d'USF-1 semble être contrôlée de manière précise par le niveau de stress cellulaire. En effet, lorsque la cellule est soumise à un stress de relativement faible intensité (UV, drogues, agents pathogènes...), la voie de la kinase p38 est induite, et permet l'activation par phosphorylation de la thréonine 153 du facteur USF-1 (Galibert, Carreira et al. 2001). Sous cette forme, USF-1 va activer à la fois l'expression des gènes de la pigmentation (*TYR*, *POMC*, *MC1R*) (Galibert, Carreira et al. 2001; Corre, Primot et al. 2004) mais va également intervenir dans le contrôle de la prolifération cellulaire en G1/S et G2/M, en régulant l'expression des gènes *CYCLIN B1*, *CDK1*, *CDK4* (Cogswell, Godlevski et al. 1995; North, Espanel et al. 1999; Pawar, Szentirmay et al. 2004). USF-1 va également jouer un rôle important dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Les agents génotoxiques, incluant les rayonnements UV, induisent un arrêt transitoire à différentes phases du cycle cellulaire, pour permettre la réparation efficace des lésions d'ADN. Cet arrêt fait appel à plusieurs facteurs, dont le gène suppresseur de tumeur *TP53* (Kapoor and Lozano 1998; Al-Mohanna, Al-Khodairy et al. 2001), qui a précédemment été montré comme étant régulé par le facteur de transcription USF-1 (Reisman and Rotter 1993).

Quand le niveau de stress devient critique pour la cellule, USF-1 subit une modification post-traductionnelle supplémentaire (M-USF-1), et n'est alors plus capable d'activer la transcription des gènes cibles. Cette diminution générale du niveau d'expression pourrait être associée à une diminution du contrôle de la prolifération cellulaire, et interviendrait alors dans la formation ou la progression du mélanome. Dans ce sens, une diminution significative de l'expression du gène *TP53* a été observée dans les lésions métastatiques, par comparaison avec les mélanomes primaires (Akslen and Morkve 1992).

En conclusion, le premier niveau de phosphorylation d'USF-1 (T153) est associé dans les mélanocytes avec le maintien du caractère différencié de la cellule et du contrôle de la prolifération cellulaire en réponse à un stress de faible intensité. Par contre, après un stress critique, M-USF-1 serait associé avec une diminution de l'activité transcriptionnelle associée à une éventuelle perte du contrôle de la prolifération cellulaire. Cette perte d'activité d'USF-1 peut être associée avec une modification post-traductionnelle, mais peut également être la conséquence d'autres mécanismes de régulation. En condition oxydative, USF-1 et -2 ont été montré comme étant polyubiquitinés pour être ensuite dégradés par le protéasome. Cette dégradation est associée avec une diminution de l'expression des gènes cibles. (Jiang and Mendelson 2005). D'autre part, USF-1 permet le recrutement des enzymes, telles que PCAF qui acétyle les histones, et SET7/92 qui méthyle l'histone H3K4 (West, Huang et al. 2004).

Ces recrutements permettent le remodelage et l'ouverture de la chromatine, favorisant l'accès de l'ADN pour la machinerie de transcription. Il est alors possible de supposer que la perte d'activité transcriptionnelle de M-USF-1 soit associée avec une perte d'interaction entre le facteur de transcription et les histones.

En conclusion, cette nouvelle forme post-traductionnelle du facteur de transcription USF-1 devrait nous permettre de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et la progression du mélanome. M-USF-1 devrait notamment donner des indications concernant l'importance du stress oxydatif dans ces processus (Meyskens, Farmer et al. 2001; Meyskens, McNulty et al. 2001; Gomez Sarosi, Rieber et al. 2003), avec un rôle éventuel du facteur de susceptibilité : PTEN (Cho, Lee et al. 2004; Connor, Subbaram et al. 2005). Dans les expériences futures, il s'agira d'identifier et de caractériser de manière précise la modification post-traductionnelle conduisant à M-USF-1. Dans ce but, des analyses de spectrométrie de masse, après purification spécifique de la nouvelle forme, sont actuellement en cours. En parallèle, nous réaliserons également des transfections de différentes constructions du facteur USF-1, mutés pour les sites potentiels de phosphorylation, afin d'identifier les sites nécessaires et indispensables pour l'apparition de la nouvelle forme. Par la suite, nous nous intéresserons de manière précise au rôle fonctionnel de M-USF-1 dans la cellule. Différentes expériences seront donc réalisées pour cela. Nous étudierons de manière générale l'implication de M-USF-1 sur la régulation transcriptionnelle des gènes, par analyse comparative par utilisation des puces ADN ; ou de manière ciblée en se focalisant sur la régulation des gènes de susceptibilité au mélanome, tels que *TP53* (Reisman and Rotter 1993), *CDKN2A* (Loercher, Tank et al. 2005), ou *CDKN1A* (Carreira, Goodall et al. 2005). Dans ce sens, des études préalables ont permis de montrer une interaction de M-USF-1 avec les promoteurs des gènes *TP53* et *CDKN2A*. Par la suite, pour déterminer le rôle de M-USF-1 sur la progression du cycle cellulaire, nous analyserons l'arrêt éventuel du cycle par FACS, en présence ou non de la forme modifiée. Enfin, des études concernant le recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine, ou des méthylations des promoteurs seront abordées, dans la mesure où ces facteurs peuvent permettre d'expliquer les variations d'expression des gènes en fonction de la forme présente d'USF-1.

Séquence des régions promotrices de *POMC* et de *MCIR*

Promoteur de *POMC*

-1147 agtgcaactcaccttcacaccacacaagacgggtcctgacttctgctccctcctcccctccccaaagt
-1080 ggaacagagagaatatgattccccacgacttccacatcacagtttccaaacaatggggaaatcggag
-1013 gcctccccgtgtgcagacgggtgatatttaccgccaatgccaaccagg**cagatg**ccagcccagcacg
boîte E
-946 cacgcaggtaacttcaccctcgctcaacgacctcagagggtgccggcctgccccacacgggggtg
-879 ctaagcctc**ccgccc**gttctaagcggagacccaacgcatccataattaagtcttctcctgagggcga
SP-1
-812 gcggc**caggtg**cgcttccggcaggacagtgctaattccagccccttccgagcgtctccccgcgctc
boîte E
-745 gtcccccgctctggaagccccctcccacgcccccgggcccccttcccctggccccggggagctgctc
-678 cttgtgctgccgggaaggtcaaagtcccgcgcccaccaggagagctcggcaagtataaaggacaga
-611 ggagcgcgggaccaagcggcggcgaaggaggggaagaagagccgcgaccgagagaggccgcccagcgcg
-544 tcc**ccgccc**tcagagagcagcctcccagacaggttaagggcgcagcgtgggggaccccgctgctctttc
SP-1
-477 cccgggatccctccgagagcttgctaggaggtcttgggacaaccgggtcttttttttttttttttgag
-410 acggagtcttgcctcttgttgcccatgctggagagcaaaggggtgatctctgctcaccgcaaccttg
-343 cctcccgggttcaagcgattctcctgcttcagcctcccagtagctgggattacaggcatgcgccac
-276 cacgcccggctaattttttagttagtgacggagtttctccatggtggctcaggctggtctca
-209 aactcccgacaa**caggtg**at**ccgccc**gccttggccccccaaagtcttggcattacaggcgcgagcca
boîte E SP-1
-142 **ccgccc**ccggccagcccgggtcttttagtatctcttgcaatggttgggtcaaggtcctccttgggtgagt
SP-1
-75 ggccaacattgttttgtccttgcaggggtcccacgaatcttgtttgcttctgcagagcctcagcctg
+1→
-8 cctggaag**atg**ccgagatcgtgctgcagccgctcgggggcccctggtgctggccttgccttcaggc
+60 ctccatggaagtgcgtggctggtgctggagagcagccagtgctcaggacctcaccacggaaagcaac
+127 ctgctggtacgtgggcatgactgccatcttggctagacattaatccagagattaaaaggcactg
+194 agaccaggcagagatggctcatggctgtaatcccagcacttttagatgctaaggtgggaggattgctt
+261 gagcccagggttcaagacaagcctgggcaacatagtgcagacctccacttctacaaaaataaaaaa
+328 gttagccagatgtggtggcatgtgctgtagtcttagctacttgggaggttcaacttgaggccaggag
+395 tctgacgacacagtaagctatgatcacaccattgcactccagctctgggtaacagaatgagacctgt

Promoteur minimal

site de liaison pour USF-1

Promoteur de MC1R

-1721 gctgggattacagccctgagccaccatggctgacaataataaaaaattttaagcaaaactaaagat
-1654 **ttataaa**ttgtaaaatgCGGTTgtaacaagtatttactgtaccagtaaataatgaaaaatattaatgt
boîte TATA
-1587 cctcacacacatggaggtggcttgtgagtgggtgtgagcatttcatgggtcagagtttggcagttgggc
-1520 gagagacaggatggattttaactcgaacatcgagacacaaaactgaaaaccctgatgCGGTgcctg
-1453 caccgttgccctcttctcctgcagctgtaaatgggacgagtaattccatccccctcccgttccaccc
-1386 ttcagcacagacgcagctcttcagcaaggaagtgtgCGGAACGCCCTGGAGTgaaccaggaagatgc
-1319 ctgCAGTGGGTGCCAGGGCCCTctccaccgtccctgctGGGCTtcGGGGCCACGCCCGACTgctgt
-1252 gaacggcctgCGGAGCACCACGTgCGACGGCTGGAGGCGAGAGGTctgcctttgatgtGGCTgttgg
-1185 tgcagggcctgtggtgccttccgcagcggaaatggcgcgcg**gcccggggagggcggg**gagcagcgtcc
AP-2 SP-1
-1118 cgggtgcccctgtgaggatgagcagcagatgactggaggggtccctgaagacctcactaggggtgccc
-1051 ccagccggtccgctcccaggaagcgacacccccacagccccagggctg**cagctg**aggggggtcgccac
boîte E
-984 tctggctgggcgaggctgggccccttgggggcaggcgccagagtggcctcaggctctacaagatgcct
-917 gaaaacaccaacctctccagggctcactagcattggacgctttcacgctctgccctggccggaagcc
-850 cctcaccgccgcgatgtgcaaaactcctgcagggctcactcagtttcagaactttaattattgga
-783 aagttctccctgggtccagccccaaatctgccgtgaacggttga**cagctg**agttgctgctccatgcgt
boîte E
-716 gctttggctgagagcagaggggaccctgtcctccctgagctgctgacgggggaggggtgaaggggtg
-649 gggcctctggagagggcaggtcccggggaagcccggactcctagag**gggcggcaggtg**ggggccct
SP-1 boîte E
-582 ggtgaccaggacagactgtggtgttttttaacgtaaaggagatccgcggtgtgagggacccccctggg
-515 tcctgcacgccgctggtggcagggccgggcatggtgggtgctcacgccccgg**catgtg**gccc
boîte E SP-1
-448 tcagtgggaggggtctgagaacgactttttaaaacgcagagaaaagctccattcttcccaggacct
-381 cagcgcagccctggcccaggaaggcaggagacagaggccaggacggtccagaggtgtcgaaatgtcc
-314 tggggacctgagcagcagccaccaggggaagaggcagggagggagctgaggaccaggcttggttgtga
-247 gaatccctgagcccaggcggtagatgccaggaggtgtctggactggtggccatgcctgggctgac
-180 ctgtccagccagggagaggggtgtgagggcagatctgggggtgccagatggaaggaggcagggcatgg
-113 gggacaccaaggccccctggcagcaccatgaactaagcaggacacctggaggggaagaactgtggg
+1→
-46 gacctggaggcctccaacgactccttctgcttctggacaggact**atgg**ctgtgcagggatcccag
+22 agaagacttctgggctccctcaactccacccccacagccatccccagctggggctggctgccaacc
+89 agacaggagcccgggtgctggaggtgtccatctctgacgggctcttctc

Promoteur minimal**site de liaison pour USF-1**

Liste des publications

Corre, S., A. Primot, et al. (2004). "UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1)." J Biol Chem **279**(49): 51226-33.

Corre, S. et M. D. Galibert. (2005) "Upstream stimulating factors : highly versatile stress-responsive transcription factors." Pigment Cell Res **18**(5): 337-48.

Corre, S. et M. D. Galibert. (2006) "USF : régulateur essentiel de la transcription." Medecine/Sciences

Corre, S., K. Mekideche, et al. (2006) "In vivo and ex vivo UV-induced analysis of pigmentation genes expression.", J Invest Dermatol.

Corre, S., et al. (2006) "Identification and characterization of a new stress-responsive form of the USF-1 transcription factor, implication in cellular process.", in prep.

Wiechers, J. W., A. V. Rawlings, et al. (2005) "A new mechanism of action for skin whitening agents : binding to the peroxisome proliferator-activated receptor." Int J Cosmetic Science **16**(1): 35-42

Hedan, B., S. Corre, et al. "Coat color in dogs: identification of a merle locus in Australian shepherd.", soumis 10/2005 BMC Veterinary Res

Communications et formations

11^{ème} Congrès annuel de ESPCR (European Society for Pigment Cell Research) à Gant (Belgique), 2003

Communication (M. D. Galibert) : "Molecular mechanism upon UV-irradiation of the alphaMSH and MC1R genes."

Conférences du Cold Spring Harbor Laboratory à Cold Spring Harbor (NY, USA), 2004 : "Cancer Genetics and Tumor Suppressor Genes."

12^{ème} Congrès annuel de ESPCR à Paris (France), 2004

Communication (M. D. Galibert) : "Dual regulation of melanocyte specific genes by two key b-HLH-LZ transcription factors: Mitf and USF-1."

Congrès annuel de recherche en Dermatologie (CARD) à Brest (France), 2005

Communication (M. D. Galibert) :

Poster : "UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1)." (Prix du meilleur poster).

19^{ème} Congrès international de ISPCR (International Society for Pigment Cell Research) à Reston (Virginie, USA), 2005

Communication (M. D. Galibert) : "UPSTREAM Stimulating Factor 1 (USF-1) : a potent stress-response transcription factor"

Poster (S. Corre) : "In vivo and ex vivo tanning response studies : two potent molecular models."

Poster (B. Hedan) : "Coat color in dogs : a powerful model for mammalian pigmentation."

Formations au cours de la thèse :

2003 : "Remue-méninge, je crée mon entreprise."

2004 : "Valorisation des compétences du doctorant."

2004 : Enseignement TD Biologie Moléculaire, Médecine.

2004 : "Ouverture à la recherche européenne."

Doctoriales Betagne 2004, 25 au 29 octobre 2004 à Lannion

Formation atelier Inserm N°160, La Londe Les Maure, 12-13 mai 2005 : "Epigénomique : analyse à grande échelle des modifications de la chromatine et des interactions entre génomes et facteurs régulateurs de la transcription"

- Abdel-Malek, Z., V. Swope, et al. (1993). "Contribution of melanogenic proteins to the heterogeneous pigmentation of human melanocytes." *J Cell Sci* **106** (Pt 4): 1323-31.
- Abdel-Malek, Z. A., M. C. Scott, et al. (2001). "The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes." *J Cell Sci* **114**(Pt 5): 1019-24.
- Aberdam, E., C. Bertolotto, et al. (1998). "Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein." *J Biol Chem* **273**(31): 19560-5.
- Ahmed, N. U., M. Ueda, et al. (1999). "High levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation." *Br J Dermatol* **140**(2): 226-31.
- Aksan, I. and C. R. Goding (1998). "Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo." *Mol Cell Biol* **18**(12): 6930-8.
- Akslen, L. A. and O. Morkve (1992). "Expression of p53 protein in cutaneous melanoma." *Int J Cancer* **52**(1): 13-6.
- Alaluf, S., K. Barrett, et al. (2003). "Ethnic variation in tyrosinase and TYRP1 expression in photoexposed and photoprotected human skin." *Pigment Cell Res* **16**(1): 35-42.
- Al-Mohanna, M. A., F. M. Al-Khodairy, et al. (2001). "p53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G(1) in mammalian cells." *Carcinogenesis* **22**(4): 573-8.
- Ancans, J., D. J. Tobin, et al. (2001). "Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells." *Exp Cell Res* **268**(1): 26-35.
- Ao, Y., H. Y. Park, et al. (1998). "Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for optimal alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced pigmentation." *Exp Cell Res* **244**(1): 117-24.
- Aoki, H. and O. Moro (2002). "Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R)." *Life Sci* **71**(18): 2171-9.
- Autier, P., M. Boniol, et al. (2004). "Sex differences in numbers of nevi on body sites of young European children: implications for the etiology of cutaneous melanoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(12): 2003-5.
- Autier, P. and J. F. Dore (1998). "Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer." *Int J Cancer* **77**(4): 533-7.
- Babiarz-Magee, L., N. Chen, et al. (2004). "The expression and activation of protease-activated receptor-2 correlate with skin color." *Pigment Cell Res* **17**(3): 241-51.
- Bahadoran, P., R. Busca, et al. (2003). "Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome." *J Biol Chem* **278**(13): 11386-92.
- Ball, N. J., J. J. Yohn, et al. (1994). "Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression." *J Invest Dermatol* **102**(3): 285-90.
- Bastiaens, M., J. ter Huurne, et al. (2001). "The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene." *Hum Mol Genet* **10**(16): 1701-8.
- Bastiaens, M. T., J. A. ter Huurne, et al. (2001). "Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair." *Am J Hum Genet* **68**(4): 884-94.

- Bastian, B. C., P. E. LeBoit, et al. (1998). "Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization." Cancer Res **58**(10): 2170-5.
- Beattie, P. E., L. E. Finlan, et al. (2005). "The effect of ultraviolet (UV) A1, UVB and solar-simulated radiation on p53 activation and p21." Br J Dermatol **152**(5): 1001-8.
- Berking, C., R. Takemoto, et al. (2001). "Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin." Am J Pathol **158**(3): 943-53.
- Boissy, R. E. (2003). "Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte." Exp Dermatol **12 Suppl 2**: 5-12.
- Bondurand, N., V. Pingault, et al. (2000). "Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome." Hum Mol Genet **9**(13): 1907-17.
- Box, N. F., D. L. Duffy, et al. (2001). "MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations." Am J Hum Genet **69**(4): 765-73.
- Box, N. F., D. L. Duffy, et al. (2001). "Melanocortin-1 receptor genotype is a risk factor for basal and squamous cell carcinoma." J Invest Dermatol **116**(2): 224-9.
- Brilliant, M. and J. Gardner (2001). "Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis." J Invest Dermatol **117**(2): 386-7.
- Brink, N., M. Szamel, et al. (2000). "Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo." Inflamm Res **49**(6): 290-6.
- Busca, R. and R. Ballotti (2000). "Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation." Pigment Cell Res **13**(2): 60-9.
- Bustamante, J., L. Bredeson, et al. (1993). "Role of melanin as a scavenger of active oxygen species." Pigment Cell Res **6**(5): 348-53.
- Byers, H. R., M. Yaar, et al. (2000). "Role of cytoplasmic dynein in melanosome transport in human melanocytes." J Invest Dermatol **114**(5): 990-7.
- C**adet, J., E. Sage, et al. (2005). "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." Mutat Res **571**(1-2): 3-17.
- Cario-Andre, M., S. Briganti, et al. (2002). "Epidermal reconstructs: a new tool to study topical and systemic photoprotective molecules." J Photochem Photobiol B **68**(2-3): 79-87.
- Carreira, S., J. Goodall, et al. (2005). "Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression." Nature **433**(7027): 764-9.
- Carreira, S., B. Liu, et al. (2000). "The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes." J Biol Chem **275**(29): 21920-7.
- Carsberg, C. J., H. M. Warenius, et al. (1994). "Ultraviolet radiation-induced melanogenesis in human melanocytes. Effects of modulating protein kinase C." J Cell Sci **107 (Pt 9)**: 2591-7.
- Chakraborty, A., A. Slominski, et al. (1995). "Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes." J Invest Dermatol **105**(5): 655-9.
- Chakraborty, A. K., Y. Funasaka, et al. (1999). "Enhanced expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R) in normal human keratinocytes during differentiation: evidence for increased expression of POMC peptides near suprabasal layer of epidermis." J Invest Dermatol **112**(6): 853-60.

- Chakraborty, A. K., Y. Funasaka, et al. (1996). "Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B." *Biochim Biophys Acta* **1313**(2): 130-8.
- Chang, A. C., M. Cochet, et al. (1980). "Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(8): 4890-4.
- Chhajlani, V. and J. E. Wikberg (1992). "Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA." *FEBS Lett* **309**(3): 417-20.
- Cho, S. H., C. H. Lee, et al. (2004). "Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling." *FEBS Lett* **560**(1-3): 7-13.
- Chudnovsky, Y., P. A. Khavari, et al. (2005). "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics." *J Clin Invest* **115**(4): 813-24.
- Cochet, M., A. C. Chang, et al. (1982). "Characterization of the structural gene and putative 5'-regulatory sequences for human proopiomelanocortin." *Nature* **297**(5864): 335-9.
- Cody, D. T., 2nd, Y. Huang, et al. (1999). "Differential DNA methylation of the p16 INK4A/CDKN2A promoter in human oral cancer cells and normal human oral keratinocytes." *Oral Oncol* **35**(5): 516-22.
- Cogswell, J. P., M. M. Godlevski, et al. (1995). "Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2782-90.
- Connor, K. M., S. Subbaram, et al. (2005). "Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation." *J Biol Chem* **280**(17): 16916-24.
- Corre, S. and M. D. Galibert (2005). "Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors." *Pigment Cell Res* **18**(5): 337-48.
- Corre, S., A. Primot, et al. (2004). "UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1)." *J Biol Chem* **279**(49): 51226-33.
- D**aniotti, M., M. Oggionni, et al. (2004). "BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma." *Oncogene* **23**(35): 5968-77.
- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* **417**(6892): 949-54.
- Davies, M. J. and R. J. Truscott (2001). "Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis." *J Photochem Photobiol B* **63**(1-3): 114-25.
- De Fabo, E. C., F. P. Noonan, et al. (2004). "Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma." *Cancer Res* **64**(18): 6372-6.
- Diffey, B. L. (2002). "Sources and measurement of ultraviolet radiation." *Methods* **28**(1): 4-13.
- Dorsky, R. I., D. W. Raible, et al. (2000). "Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway." *Genes Dev* **14**(2): 158-62.
- Douki, T., D. Perdiz, et al. (1999). "Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role." *Photochem Photobiol* **70**(2): 184-90.
- Drouin, J., M. Chamberland, et al. (1985). "Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene." *FEBS Lett* **193**(1): 54-8.
- Du, J. and D. E. Fisher (2002). "Identification of Aim-1 as the underwhite mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF." *J Biol Chem* **277**(1): 402-6.
- Du, J., A. J. Miller, et al. (2003). "MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma." *Am J Pathol* **163**(1): 333-43.

- Duffy, D. L., N. F. Box, et al. (2004). "Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes." Hum Mol Genet **13**(4): 447-61.
- Duval, C., M. Regnier, et al. (2001). "Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure." Pigment Cell Res **14**(5): 348-55.
- Duval, C., R. Schmidt, et al. (2003). "The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy." Exp Dermatol **12 Suppl 2**: 64-70.
- Eizirik, E., N. Yuhki, et al. (2003). "Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family." Curr Biol **13**(5): 448-53.
- Everts, R. E., J. Rothuizen, et al. (2000). "Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour." Anim Genet **31**(3): 194-9.
- Fang, D. and V. Setaluri (1999). "Role of microphthalmia transcription factor in regulation of melanocyte differentiation marker TRP-1." Biochem Biophys Res Commun **256**(3): 657-63.
- Flanagan, N., E. Healy, et al. (2000). "Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation." Hum Mol Genet **9**(17): 2531-7.
- Fornace, A. J., Jr. (1983). "Recombination of parent and daughter strand DNA after UV-irradiation in mammalian cells." Nature **304**(5926): 552-4.
- Freeman, S. E., H. Hacham, et al. (1989). "Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5605-9.
- Funasaka, Y., A. K. Chakraborty, et al. (1998). "Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha." Br J Dermatol **139**(2): 216-24.
- Fuse, N., K. Yasumoto, et al. (1999). "Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus." J Biochem (Tokyo) **126**(6): 1043-51.
- Galibert, M. D., S. Carreira, et al. (2001). "The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression." Embo J **20**(17): 5022-31.
- Galibert, M. D., U. Yavuzer, et al. (1999). "Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter." J Biol Chem **274**(38): 26894-900.
- Gardner, J. M., Y. Nakatsu, et al. (1992). "The mouse pink-eyed dilution gene: association with human Prader-Willi and Angelman syndromes." Science **257**(5073): 1121-4.
- Gilchrest, B. A., H. Y. Park, et al. (1996). "Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation." Photochem Photobiol **63**(1): 1-10.
- Godar, D. (2005). "UV Doses Worldwide." Photochem Photobiol.
- Goding, C. R. (2000). "Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage." Genes Dev **14**(14): 1712-28.
- Gomez Sarosi, L. A., M. S. Rieber, et al. (2003). "Hydrogen peroxide increases a 55-kDa tyrosinase concomitantly with induction of p53-dependent p21 waf1 expression and a greater Bax/Bcl-2 ratio in pigmented melanoma." Biochem Biophys Res Commun **312**(2): 355-9.
- Gorden, A., I. Osman, et al. (2003). "Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues." Cancer Res **63**(14): 3955-7.

- Graf, J., R. Hodgson, et al. (2005). "Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation." Hum Mutat **25**(3): 278-84.
- Graham, A., K. Wakamatsu, et al. (1997). "Agouti protein inhibits the production of eumelanin and pheomelanin in the presence and absence of alpha-melanocyte stimulating hormone." Pigment Cell Res **10**(5): 298-303.
- Greulich, K. M., J. Utikal, et al. (2000). "c-MYC and nodular malignant melanoma. A case report." Cancer **89**(1): 97-103.
- Guldberg, P., P. thor Straten, et al. (1997). "Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma." Cancer Res **57**(17): 3660-3.
- Hachiya, A., A. Kobayashi, et al. (2001). "The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation." J Invest Dermatol **116**(4): 578-86.
- Hadley, M. E. and C. Haskell-Luevano (1999). "The proopiomelanocortin system." Ann N Y Acad Sci **885**: 1-21.
- Halaban, R., B. S. Kwon, et al. (1988). "bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas." Oncogene Res **3**(2): 177-86.
- Hansdottir, A. G., K. Palsdottir, et al. (2004). "The novel mouse microphthalmia mutations Mitfmi-enu5 and Mitfmi-bcc2 produce dominant negative Mitf proteins." Genomics **83**(5): 932-5.
- Hansen, I. A., T. T. To, et al. (2003). "The pro-opiomelanocortin gene of the zebrafish (*Danio rerio*)." Biochem Biophys Res Commun **303**(4): 1121-8.
- Hara, M., M. Yaar, et al. (2000). "Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites." J Invest Dermatol **114**(3): 438-43.
- Hayward, N. K. (2003). "Genetics of melanoma predisposition." Oncogene **22**(20): 3053-62.
- Healy, E., S. A. Jordan, et al. (2001). "Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals." Hum Mol Genet **10**(21): 2397-402.
- Hemesath, T. J., E. Steingrimsson, et al. (1994). "microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family." Genes Dev **8**(22): 2770-80.
- Herlyn, M., C. Berking, et al. (2000). "Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation." Melanoma Res **10**(4): 303-12.
- Hilario, E., I. Lihmann, et al. (1990). "Characterization of the cDNA encoding proopiomelanocortin in the frog *Rana ridibunda*." Biochem Biophys Res Commun **173**(2): 653-9.
- Honoki, K., T. Tsujiuchi, et al. (2004). "Expression of the p16INK4a gene and methylation pattern of CpG sites in the promoter region in rat tumor cell lines." Mol Carcinog **39**(1): 10-4.
- Hou, L., J. J. Panthier, et al. (2000). "Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF." Development **127**(24): 5379-89.
- Huber, W. E., E. R. Price, et al. (2003). "A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes." J Biol Chem **278**(46): 45224-30.
- Hume, A. N., L. M. Collinson, et al. (2001). "Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes." J Cell Biol **152**(4): 795-808.

Hunt, G., S. Kyne, et al. (1995). "Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes." Pigment Cell Res **8**(4): 202-8.

Hwang, P. H., H. K. Yi, et al. (2001). "Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene." Cancer Lett **172**(1): 83-91.

I Imokawa, G. (2004). "Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders." Pigment Cell Res **17**(2): 96-110.

Imokawa, G., T. Kobayashi, et al. (1997). "The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis." Pigment Cell Res **10**(4): 218-28.

Imokawa, G., T. Kobayashi, et al. (2000). "Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor." J Biol Chem **275**(43): 33321-8.

Ito, T. (1992). "The effects of vacuum-UV radiation (50-190nm) on microorganisms and DNA." Adv Space Res **12**(4): 249-53.

J Jablonski, N. G. and G. Chaplin (2000). "The evolution of human skin coloration." J Hum Evol **39**(1): 57-106.

Jannot, A. S., R. Meziari, et al. (2005). "Allele variations in the OCA2 gene (pink-eyed-dilution locus) are associated with genetic susceptibility to melanoma." Eur J Hum Genet.

Jeannotte, L., M. A. Trifiro, et al. (1987). "Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter." Mol Cell Biol **7**(11): 4058-64.

Jhappan, C., F. P. Noonan, et al. (2003). "Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma." Oncogene **22**(20): 3099-112.

Jiang, B. and C. R. Mendelson (2005). "O₂ Enhancement of Human Trophoblast Differentiation and hCYP19 (Aromatase) Gene Expression Are Mediated by Proteasomal Degradation of USF1 and USF2." Mol Cell Biol **25**(20): 8824-33.

Jiang, W., H. N. Ananthaswamy, et al. (1999). "p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation." Oncogene **18**(29): 4247-53.

Jiao, Z., R. Mollaaghbababa, et al. (2004). "Direct interaction of Sox10 with the promoter of murine Dopachrome Tautomerase (Dct) and synergistic activation of Dct expression with Mitf." Pigment Cell Res **17**(4): 352-62.

Jimbow, K., C. Hua, et al. (2000). "Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in eu- and pheomelanosome biogenesis." Pigment Cell Res **13 Suppl 8**: 110-7.

Jimenez-Cervantes, C., M. Martinez-Esparza, et al. (2001). "Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor." J Cell Sci **114**(Pt 12): 2335-44.

Jotereau, F., N. Labarriere, et al. (2003). "[Passive immunotherapy of melanoma]." Bull Cancer **90**(7): 583-6.

K Kadekaro, A. L., R. J. Kavanagh, et al. (2003). "Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round?" Pigment Cell Res **16**(5): 434-47.

Kapoor, M. and G. Lozano (1998). "Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2834-7.

- Kennedy, C., J. ter Huurne, et al. (2001). "Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color." *J Invest Dermatol* **117**(2): 294-300.
- Kerje, S., J. Lind, et al. (2003). "Melanocortin 1-receptor (MC1R) mutations are associated with plumage colour in chicken." *Anim Genet* **34**(4): 241-8.
- Khaled, M., L. Larribere, et al. (2002). "Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis." *J Biol Chem* **277**(37): 33690-7.
- Khlghatian, M. K., I. M. Hadshiew, et al. (2002). "Tyrosinase gene expression is regulated by p53." *J Invest Dermatol* **118**(1): 126-32.
- Kielbassa, C., L. Roza, et al. (1997). "Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light." *Carcinogenesis* **18**(4): 811-6.
- Kijas, J. M., R. Wales, et al. (1998). "Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs." *Genetics* **150**(3): 1177-85.
- King, R. A., J. Pietsch, et al. (2003). "Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype." *Hum Genet* **113**(6): 502-13.
- Kitano, Y. and F. Hu (1969). "The effects of ultraviolet light on mammalian pigment cells in vitro." *J Invest Dermatol* **52**(1): 25-31.
- Kobayashi, N., T. Muramatsu, et al. (1993). "Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells." *J Invest Dermatol* **101**(5): 685-9.
- Kobayashi, T., G. Imokawa, et al. (1998). "Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein)." *J Biol Chem* **273**(48): 31801-5.
- Kobayashi, T., K. Urabe, et al. (1994). "Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis." *Embo J* **13**(24): 5818-25.
- Kraehn, G. M., J. Utikal, et al. (2001). "Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases." *Br J Cancer* **84**(1): 72-9.
- Kumar, R., S. Angelini, et al. (2003). "Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9." *Oncogene* **22**(58): 9217-24.
- Kumar, R., S. Angelini, et al. (2004). "BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi." *J Invest Dermatol* **122**(2): 342-8.
- Kvam, E. and R. M. Tyrrell (1997). "Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation." *Carcinogenesis* **18**(12): 2379-84.
- Larue, L., M. Kumasaka, et al. (2003). "Beta-catenin in the melanocyte lineage." *Pigment Cell Res* **16**(3): 312-7.
- Lassalle, M. W., S. Igarashi, et al. (2003). "Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultured human melanocytes." *Pigment Cell Res* **16**(1): 81-4.
- Le Douarin, N. M. and E. Dupin (2003). "Multipotentiality of the neural crest." *Curr Opin Genet Dev* **13**(5): 529-36.
- Loercher, A. E., E. M. Tank, et al. (2005). "MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A." *J Cell Biol* **168**(1): 35-40.
- Ludwig, A., S. Rehberg, et al. (2004). "Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors." *FEBS Lett* **556**(1-3): 236-44.
- Makova, K. and H. Norton (2005). "Worldwide polymorphism at the MC1R locus and normal pigmentation variation in humans." *Peptides*.

- Makova, K. D., M. Ramsay, et al. (2001). "Human DNA sequence variation in a 6.6-kb region containing the melanocortin 1 receptor promoter." *Genetics* **158**(3): 1253-68.
- Maldonado, J. L., J. Fridlyand, et al. (2003). "Determinants of BRAF mutations in primary melanomas." *J Natl Cancer Inst* **95**(24): 1878-90.
- Mansky, K. C., U. Sankar, et al. (2002). "Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling." *J Biol Chem* **277**(13): 11077-83.
- Mas, J. S., I. Gerritsen, et al. (2003). "Rate limiting factors in melanocortin 1 receptor signalling through the cAMP pathway." *Pigment Cell Res* **16**(5): 540-7.
- Matichard, E., P. Verpillat, et al. (2004). "Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure." *J Med Genet* **41**(2): e13.
- Matsui, M. S. and V. A. DeLeo (1991). "Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer." *Cancer Cells* **3**(1): 8-12.
- McGill, G. G., M. Horstmann, et al. (2002). "Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability." *Cell* **109**(6): 707-18.
- Meier, F., K. Satyamoorthy, et al. (1998). "Molecular events in melanoma development and progression." *Front Biosci* **3**: D1005-10.
- Mercer, K. E. and C. A. Pritchard (2003). "Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target." *Biochim Biophys Acta* **1653**(1): 25-40.
- Merlo, A., J. G. Herman, et al. (1995). "5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers." *Nat Med* **1**(7): 686-92.
- Meyskens, F. L., Jr., P. Farmer, et al. (2001). "Redox regulation in human melanocytes and melanoma." *Pigment Cell Res* **14**(3): 148-54.
- Meyskens, F. L., Jr., S. E. McNulty, et al. (2001). "Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes." *Free Radic Biol Med* **31**(6): 799-808.
- Miller, A. J., C. Levy, et al. (2005). "Sumoylation of MITF and Its Related Family Members TFE3 and TFEB." *J Biol Chem* **280**(1): 146-155.
- Moro, O., R. Ideta, et al. (1999). "Characterization of the promoter region of the human melanocortin-1 receptor (MC1R) gene." *Biochem Biophys Res Commun* **262**(2): 452-60.
- Mountjoy, K. G., L. S. Robbins, et al. (1992). "The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors." *Science* **257**(5074): 1248-51.
- Mundy, N. I., N. S. Badcock, et al. (2004). "Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice." *Science* **303**(5665): 1870-3.
- Nesbit, M., H. K. Nesbit, et al. (1999). "Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes." *Oncogene* **18**(47): 6469-76.
- Newton, J. M., A. L. Wilkie, et al. (2000). "Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog." *Mamm Genome* **11**(1): 24-30.
- North, S., X. Espanel, et al. (1999). "Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs)." *Oncogene* **18**(11): 1945-55.
- Nylander, K., J. C. Bourdon, et al. (2000). "Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response." *J Pathol* **190**(1): 39-46.

- Oetting, W. S., S. S. Garrett, et al. (2005). "P gene mutations associated with oculocutaneous albinism type II (OCA2)." *Hum Mutat* **25**(3): 323.
- Opdecamp, K., A. Nakayama, et al. (1997). "Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor." *Development* **124**(12): 2377-86.
- Ou-Yang, H., G. Stamatias, et al. (2004). "Spectral responses of melanin to ultraviolet A irradiation." *J Invest Dermatol* **122**(2): 492-6.
- Padua, R. A., N. C. Barrass, et al. (1985). "Activation of N-ras in a human melanoma cell line." *Mol Cell Biol* **5**(3): 582-5.
- Palmer, J. S., D. L. Duffy, et al. (2000). "Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype?" *Am J Hum Genet* **66**(1): 176-86.
- Papp, T., H. Pemsel, et al. (2003). "Mutational analysis of N-ras, p53, CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDK4, and MC1R genes in human dysplastic melanocytic naevi." *J Med Genet* **40**(2): E14.
- Park, H. Y., J. M. Perez, et al. (1999). "Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain." *J Biol Chem* **274**(23): 16470-8.
- Park, H. Y., V. Russakovsky, et al. (1996). "Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C." *Exp Cell Res* **227**(1): 70-9.
- Parmiter, A. H., G. Balaban, et al. (1988). "Possible involvement of the chromosome region 10q24---q26 in early stages of melanocytic neoplasia." *Cancer Genet Cytogenet* **30**(2): 313-7.
- Passeron, T., P. Bahadoran, et al. (2004). "Cyclic AMP promotes a peripheral distribution of melanosomes and stimulates melanophilin/Slac2-a and actin association." *Faseb J* **18**(9): 989-91.
- Patton, E. E., H. R. Widlund, et al. (2005). "BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma." *Curr Biol* **15**(3): 249-54.
- Pavey, S. and B. Gabrielli (2002). "Alpha-melanocyte stimulating hormone potentiates p16/CDKN2A expression in human skin after ultraviolet irradiation." *Cancer Res* **62**(3): 875-80.
- Pawar, S. A., M. N. Szentirmay, et al. (2004). "Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc." *Oncogene* **23**(36): 6125-35.
- Pawelek, J. M., A. K. Chakraborty, et al. (1992). "Molecular cascades in UV-induced melanogenesis: a central role for melanotropins?" *Pigment Cell Res* **5**(5 Pt 2): 348-56.
- Pedley, J., E. M. Ablett, et al. (1996). "Inhibition of retinoblastoma protein translation by UVB in human melanocytic cells and reduced cell cycle arrest following repeated irradiation." *Oncogene* **13**(6): 1335-42.
- Perdiz, D., P. Grof, et al. (2000). "Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis." *J Biol Chem* **275**(35): 26732-42.
- Peris, K., M. C. Fargnoli, et al. (2004). "CDKN2A and MC1R mutations in patients with sporadic multiple primary melanoma." *J Invest Dermatol* **122**(5): 1327-30.
- Pfeifer, G. P., Y. H. You, et al. (2005). "Mutations induced by ultraviolet light." *Mutat Res* **571**(1-2): 19-31.

- Piepkorn, M. (2000). "The expression of p16(INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation." J Am Acad Dermatol **42**(5 Pt 1): 741-5.
- Polsky, D. (2005). "The ABCDEs of melanoma: an evolving concept." J Drugs Dermatol **4**(3): 399-401.
- Potterf, S. B., M. Furumura, et al. (2000). "Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3." Hum Genet **107**(1): 1-6.
- Puig, S., J. Malvehy, et al. (2005). "Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas." J Clin Oncol **23**(13): 3043-51.
- R**adhi, J. M. (1999). "Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components." J Cutan Med Surg **3**(6): 293-7.
- Ragnarsson-Olding, B., A. Platz, et al. (2004). "p53 protein expression and TP53 mutations in malignant melanomas of sun-sheltered mucosal membranes versus chronically sun-exposed skin." Melanoma Res **14**(5): 395-401.
- Ragnarsson-Olding, B. K., S. Karsberg, et al. (2002). "Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes." Melanoma Res **12**(5): 453-63.
- Ramsay, M., M. A. Colman, et al. (1992). "The tyrosinase-positive oculocutaneous albinism locus maps to chromosome 15q11.2-q12." Am J Hum Genet **51**(4): 879-84.
- Rana, B. K., D. Hewett-Emmett, et al. (1999). "High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus." Genetics **151**(4): 1547-57.
- Ray, M. E., G. Wistow, et al. (1997). "AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3229-34.
- Rees, J. L. (2004). "The genetics of sun sensitivity in humans." Am J Hum Genet **75**(5): 739-51.
- Regnier, M., C. Duval, et al. (1999). "Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **45**(7): 969-80.
- Reisman, D. and V. Rotter (1993). "The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene." Nucleic Acids Res **21**(2): 345-50.
- Rivers, J. K. (2004). "Is there more than one road to melanoma?" Lancet **363**(9410): 728-30.
- Rizos, H., A. P. Darmanian, et al. (2001). "Mutations in the INK4a/ARF melanoma susceptibility locus functionally impair p14ARF." J Biol Chem **276**(44): 41424-34.
- Rizos, H., S. Puig, et al. (2001). "A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF." Oncogene **20**(39): 5543-7.
- Robinson, K. A., C. A. Stewart, et al. (1999). "Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture." J Neurosci Res **55**(6): 724-32.
- Rodolfo, M., M. Daniotti, et al. (2004). "Genetic progression of metastatic melanoma." Cancer Lett **214**(2): 133-47.
- Romero-Graillet, C., E. Aberdam, et al. (1996). "Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes." J Biol Chem **271**(45): 28052-6.
- Roseblat, S., D. Durham-Pierre, et al. (1994). "Identification of a melanosomal membrane protein encoded by the pink-eyed dilution (type II oculocutaneous albinism) gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12071-75.

- Rouzaud, F., A. L. Kadekaro, et al. (2005). "MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation." *Mutat Res* **571**(1-2): 133-52.
- Ruiz, A., S. Puig, et al. (1998). "Retention of the CDKN2A locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma." *Int J Cancer* **76**(3): 312-6.
- Saito, H., K. Yasumoto, et al. (2003). "Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway." *Pigment Cell Res* **16**(3): 261-5.
- Sanchez-Martin, M., A. Rodriguez-Garcia, et al. (2002). "SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease." *Hum Mol Genet* **11**(25): 3231-6.
- Sasaki, M., T. Horikoshi, et al. (2000). "Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes." *Pigment Cell Res* **13**(4): 248-52.
- Schallreuter, K. U., J. Moore, et al. (1999). "alpha-MSH can control the essential cofactor 6-tetrahydrobiopterin in melanogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **885**: 329-41.
- Schallreuter, K. U., U. Wazir, et al. (2004). "Human phenylalanine hydroxylase is activated by H₂O₂: a novel mechanism for increasing the L-tyrosine supply for melanogenesis in melanocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(1): 88-92.
- Schallreuter, K. U., J. M. Wood, et al. (1994). "Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin." *Science* **263**(5152): 1444-6.
- Schauer, E., F. Trautinger, et al. (1994). "Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes." *J Clin Invest* **93**(5): 2258-62.
- Schiaffino, M. V. and C. Tacchetti (2005). "The ocular albinism type 1 (OA1) protein and the evidence for an intracellular signal transduction system involved in melanosome biogenesis." *Pigment Cell Res* **18**(4): 227-33.
- Schwahn, D. J., N. A. Timchenko, et al. (2005). "Dynamic regulation of the human dopachrome tautomerase promoter by MITF, ER-alpha and chromatin remodelers during proliferation and senescence of human melanocytes." *Pigment Cell Res* **18**(3): 203-13.
- Scott, M. C., I. Suzuki, et al. (2002). "Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation." *Pigment Cell Res* **15**(6): 433-9.
- Scott, M. C., K. Wakamatsu, et al. (2002). "Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation." *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2349-55.
- Seabra, M. C., E. H. Mules, et al. (2002). "Rab GTPases, intracellular traffic and disease." *Trends Mol Med* **8**(1): 23-30.
- Seiberg, M., C. Paine, et al. (2000). "The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions." *Exp Cell Res* **254**(1): 25-32.
- Sharpless, E. and L. Chin (2003). "The INK4a/ARF locus and melanoma." *Oncogene* **22**(20): 3092-8.
- Shen, H., Z. Liu, et al. (2003). "p53 codon 72 Arg homozygotes are associated with an increased risk of cutaneous melanoma." *J Invest Dermatol* **121**(6): 1510-4.
- Shinozaki, M., A. Fujimoto, et al. (2004). "Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas." *Clin Cancer Res* **10**(5): 1753-7.
- Smit, N. P., A. A. Vink, et al. (2001). "Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes." *Photochem Photobiol* **74**(3): 424-30.
- Smith, A. G., N. F. Box, et al. (2001). "The human melanocortin-1 receptor locus: analysis of transcription unit, locus polymorphism and haplotype evolution." *Gene* **281**(1-2): 81-94.

- Spritz, R. A. (1994). "Molecular basis of human piebaldism." *J Invest Dermatol* **103**(5 Suppl): 137S-140S.
- Steingrimsson, E., H. Arnheiter, et al. (2003). "Interallelic complementation at the mouse *Mitf* locus." *Genetics* **163**(1): 267-76.
- Strom, M., A. N. Hume, et al. (2002). "A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport." *J Biol Chem* **277**(28): 25423-30.
- Sturm, R. A., D. L. Duffy, et al. (2003). "The role of melanocortin-1 receptor polymorphism in skin cancer risk phenotypes." *Pigment Cell Res* **16**(3): 266-72.
- Sturm, R. A., R. D. Teasdale, et al. (2001). "Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation." *Gene* **277**(1-2): 49-62.
- Swope, V. B., E. E. Medrano, et al. (1995). "Long-term proliferation of human melanocytes is supported by the physiologic mitogens alpha-melanotropin, endothelin-1, and basic fibroblast growth factor." *Exp Cell Res* **217**(2): 453-9.
- Syrris, P., K. Heathcote, et al. (2002). "Human piebaldism: six novel mutations of the proto-oncogene *KIT*." *Hum Mutat* **20**(3): 234.
- Tachibana, M., Y. Kobayashi, et al. (2003). "Mouse models for four types of Waardenburg syndrome." *Pigment Cell Res* **16**(5): 448-54.
- Tachibana, M., L. A. Perez-Jurado, et al. (1994). "Cloning of *MITF*, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3." *Hum Mol Genet* **3**(4): 553-7.
- Tada, A., I. Suzuki, et al. (1998). "Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation." *Cell Growth Differ* **9**(7): 575-84.
- Takeda, K., C. Takemoto, et al. (2000). "Ser298 of *MITF*, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance." *Hum Mol Genet* **9**(1): 125-32.
- Tanami, H., I. Imoto, et al. (2004). "Involvement of overexpressed wild-type *BRAF* in the growth of malignant melanoma cell lines." *Oncogene* **23**(54): 8796-804.
- Tassabehji, M., V. E. Newton, et al. (1994). "Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (*MITF*) gene." *Nat Genet* **8**(3): 251-5.
- Thody, A. J. and A. Graham (1998). "Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?" *Pigment Cell Res* **11**(5): 265-74.
- Thompson, J. F., R. A. Scolyer, et al. (2005). "Cutaneous melanoma." *Lancet* **365**(9460): 687-701.
- Tomita, Y. and T. Suzuki (2004). "Genetics of pigmentary disorders." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **131C**(1): 75-81.
- Tommasi, S., P. M. Swiderski, et al. (1996). "Inhibition of transcription factor binding by ultraviolet-induced pyrimidine dimers." *Biochemistry* **35**(49): 15693-703.
- Tsao, H., X. Zhang, et al. (1998). "Identification of *PTEN/MMAC1* alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines." *Oncogene* **16**(26): 3397-402.
- Tsatmali, M., J. Ancans, et al. (2000). "Skin POMC peptides: their actions at the human MC-1 receptor and roles in the tanning response." *Pigment Cell Res* **13 Suppl 8**: 125-9.
- Tsatmali, M., A. Graham, et al. (2000). "alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes." *J Invest Dermatol* **114**(3): 520-6.
- Tsatmali, M., K. Wakamatsu, et al. (1999). "Skin POMC peptides. Their binding affinities and activation of the human MC1 receptor." *Ann N Y Acad Sci* **885**: 466-9.

- Tsujimura, T., E. Morii, et al. (1996). "Involvement of transcription factor encoded by the *mi* locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice." *Blood* **88**(4): 1225-33.
- Tyrrell, R. M. (1984). "Mutagenic action of monochromatic UV radiation in the solar range on human cells." *Mutat Res* **129**(1): 103-10.
- Vafa, O., M. Wade, et al. (2002). "c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability." *Mol Cell* **9**(5): 1031-44.
- Valverde, P., E. Healy, et al. (1995). "Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans." *Nat Genet* **11**(3): 328-30.
- Valverde, P., P. Manning, et al. (1996). "Activation of tyrosinase reduces the cytotoxic effects of the superoxide anion in B16 mouse melanoma cells." *Pigment Cell Res* **9**(2): 77-84.
- van 't Veer, L. J., B. M. Burgering, et al. (1989). "N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites." *Mol Cell Biol* **9**(7): 3114-6.
- Vance, K. W. and C. R. Goding (2004). "The transcription network regulating melanocyte development and melanoma." *Pigment Cell Res* **17**(4): 318-25.
- Vetrini, F., A. Auricchio, et al. (2004). "The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene: link between melanin synthesis and melanosome biogenesis." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6550-9.
- Vidal, M. J., F. Loganzo, Jr., et al. (1995). "Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas." *Melanoma Res* **5**(4): 243-50.
- Virador, V. M., J. Muller, et al. (2002). "Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes." *Faseb J* **16**(1): 105-7.
- Voisey, J. and A. van Daal (2002). "Agouti: from mouse to man, from skin to fat." *Pigment Cell Res* **15**(1): 10-8.
- Wakamatsu, K., A. Graham, et al. (1997). "Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor." *Pigment Cell Res* **10**(5): 288-97.
- Watabe, H., J. C. Valencia, et al. (2004). "Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity." *J Biol Chem* **279**(9): 7971-81.
- Watanabe, A., K. Takeda, et al. (1998). "Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3." *Nat Genet* **18**(3): 283-6.
- Wellbrock, C., L. Ogilvie, et al. (2004). "V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes." *Cancer Res* **64**(7): 2338-42.
- West, A. G., S. Huang, et al. (2004). "Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element." *Mol Cell* **16**(3): 453-63.
- Whitfeld, P. L., P. H. Seeburg, et al. (1982). "The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence, and interspersed with repetitive DNA." *DNA* **1**(2): 133-43.
- Widlund, H. R. and D. E. Fisher (2003). "Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival." *Oncogene* **22**(20): 3035-41.
- Wintzen, M. and B. A. Gilchrist (1996). "Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin." *J Invest Dermatol* **106**(1): 3-10.
- Wintzen, M., M. Yaar, et al. (1996). "Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes." *J Invest Dermatol* **106**(4): 673-8.

- Wong, T. H. and J. L. Rees (2005). "The relation between melanocortin 1 receptor (MC1R) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation." Peptides.
- Wood, J. M., B. Chavan, et al. (2004). "Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H₂O₂." Biochem Biophys Res Commun **325**(4): 1412-7.
- Wu, H., V. Goel, et al. (2003). "PTEN signaling pathways in melanoma." Oncogene **22**(20): 3113-22.
- Wu, X., K. Rao, et al. (2001). "Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle." J Cell Sci **114**(Pt 6): 1091-100.
- X**u, Q., T. Konta, et al. (2004). "Cellular defense against H₂O₂-induced apoptosis via MAP kinase-MKP-1 pathway." Free Radic Biol Med **36**(8): 985-93.
- Xu, W., L. Gong, et al. (2000). "Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9." Exp Cell Res **255**(2): 135-43.
- Y**annelli, J. R. and J. M. Wroblewski (2004). "On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy." Vaccine **23**(1): 97-113.
- Yasumoto, K., S. Amai, et al. (1998). "A big gene linked to small eyes encodes multiple Mitf isoforms: many promoters make light work." Pigment Cell Res **11**(6): 329-36.
- Yasumoto, K., K. Yokoyama, et al. (1994). "Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene." Mol Cell Biol **14**(12): 8058-70.
- Yasumoto, K., K. Yokoyama, et al. (1997). "Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes." J Biol Chem **272**(1): 503-9.
- Yohn, J. J., J. G. Morelli, et al. (1993). "Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1." J Invest Dermatol **100**(1): 23-6.
- You, Y. H., D. H. Lee, et al. (2001). "Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells." J Biol Chem **276**(48): 44688-94.
- Young, A. R., C. S. Potten, et al. (1998). "Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers." J Invest Dermatol **111**(6): 936-40.
- Z**arzour, W., R. Kleta, et al. (2005). "Two novel CHS1 (LYST) mutations: clinical correlations in an infant with Chediak-Higashi syndrome." Mol Genet Metab **85**(2): 125-32.
- Zerp, S. F., A. van Elsas, et al. (1999). "p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis." Br J Cancer **79**(5-6): 921-6.