



HAL
open science

Identification d'un nouveau gène dans la pigmentation cutanée - CLEC12B

Laura Sormani

► **To cite this version:**

Laura Sormani. Identification d'un nouveau gène dans la pigmentation cutanée - CLEC12B. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6037 . tel-03000151

HAL Id: tel-03000151

<https://theses.hal.science/tel-03000151>

Submitted on 11 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Identification d'un nouveau gène dans la pigmentation cutanée : *CLEC12B*

Laura SORMANI

INSERM U1065 – Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Sciences
de la Vie et de la Santé**

Mention : Interactions Moléculaires
et Cellulaires

Dirigée par : Thierry PASSERON

Soutenue le : 11 Décembre 2019

Devant le jury, composé de :

Thierry PASSERON, DR, PUPH,
INSERM U1065, CHU Nice

Robert BALLOTTI, DR,
INSERM U1065, C3M, Nice

Muriel CARIO, CR,
INSERM U1035, Bordeaux

Marie-Dominique GALIBERT, DR,
PUPH, CNRS UMR 6290, CHU Rennes

Identification d'un nouveau gène dans la pigmentation cutanée : *CLEC12B*

Composition du jury :

Directeur de Thèse

PASSERON Thierry, DR, PUPH, INSERM U1065, CHU Nice

Président du jury

BALLOTTI Robert, DR, INSERM U1065, C3M, Nice

Rapporteurs

CARIO Muriel, CR, INSERM U1035, Bordeaux

GALIBERT Marie-Dominique, PUPH, DR, CNRS UMR 6290, CHU de Rennes

Abstract

Melanogenesis is a complex and tightly regulated process. A transcriptome analysis in lesional and non-lesional skin of vitiligo patients compared to healthy controls allowed us to identify a new gene CLEC12B, which is only expressed in controls and in non-lesional skin of vitiligo patients. The decreased expression of CLEC12B in lesional skin of vitiligo patients is comparable to the one observed for key melanocytic genes such as TYR, TYRP1 or DCT suggesting that CLEC12B could be an important melanocytic gene.

CLEC12B is a member of the C-type lectin family, which are transmembrane receptors that possess an ITIM domain which can recruit phosphatases. So far, only few data are available on this gene that is essentially reported in myeloid cells. Ligand and downstream signaling of CLEC12B are unknown and to date, no link has been reported between CLEC12B and pigmentation.

We demonstrated that CLEC12B is selectively expressed in melanocytes, and that its expression is decreased in highly pigmented skin compared to white skin. Silencing of CLEC12B in normal human melanocytes (NHM) by short hairpin RNA induced a significant increase in melanin production. On the contrary, CLEC12B overexpression using lentiviral vector resulted in significant loss of pigmentation in NHM. These results were confirmed using a reconstructed human epidermis model. Using a mutant of the ITIM domain of CLEC12B, we showed that CLEC12B directly recruits and activates SHP2, leading to the negative regulation of CREB, MITF and melanogenesis enzymes such as tyrosinase and DCT accordingly to the pigmentary phenotypes observed. These results provide novel insights not only for the development of melanogenic agents in the clinical and cosmetic fields, but also for a better understanding of the melanocyte biology and regulation of melanogenesis.

Key words: CLEC12B, skin pigmentation, melanogenesis, SHP1 and SHP2.

Résumé

La mélanogenèse est un processus complexe et étroitement régulé. Une étude transcriptomique à large échelle a été réalisée sur des peaux lésionnelles de patients atteints de vitiligo (dépourvues de mélanocytes et donc de pigmentation) comparées à des peaux non lésionnelles et des peaux de sujets sains. L'analyse différentielle des transcrits a permis la découverte d'un nouveau gène dont l'expression est significativement régulée négativement, dans les peaux lésionnelles, en comparaison avec les peaux non lésionnelles ou saines : *CLEC12B*. Le degré de régulation de *CLEC12B* était similaire à ceux observés pour les enzymes clés de la mélanogenèse (TYR, TYRP1 ou DCT) suggérant que *CLEC12B* pourrait être un gène mélanocytaire important et jouer un rôle, jusqu'ici inconnu, dans la pigmentation cutanée.

CLEC12B est membre de la famille des lectines de type C, qui sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine ITIM capable de recruter et d'activer SHP1 et SHP2. Ces phosphatases régulent de nombreuses voies de signalisation cellulaire impliquées dans des processus biologiques importants. À ce jour, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant *CLEC12B* qui a uniquement été rapporté dans les cellules myéloïdes. Son ligand, ainsi que les voies de signalisation en aval, n'ont toujours pas été identifiés et aucun lien n'a été rapporté entre *CLEC12B* et la pigmentation cutanée.

Nous avons montré, pour la première fois, que *CLEC12B* est exprimé par les mélanocytes humains normaux (NHM) et que son expression dépend du phototype de la peau. La modulation de l'expression de *CLEC12B* par shRNA induit une augmentation

significative de la production de mélanines dans les NHMs. Au contraire, la surexpression de CLEC12B entraîne une diminution significative de la pigmentation. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un modèle d'épiderme humain reconstruit. L'utilisation d'un mutant du domaine ITIM de CLEC12B nous a permis de montrer que CLEC12B recrute et active directement les phosphatases SHP1 et SHP2 dans les mélanocytes. Ceci conduit à la régulation négative des facteurs de transcription CREB et MITF ainsi que des enzymes de la mélanogenèse (TYR, TYRP1 et DCT).

Ce nouvel apport dans la compréhension de la physiologie de la pigmentation cutanée pourrait permettre, *in fine*, à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir un jour au développement d'agents dans le traitement clinique et cosmétique des troubles pigmentaires.

Mots clefs : CLEC12B, pigmentation cutanée, mélanogenèse, SHP1 et SHP2.

Remerciements

Aux membres de mon jury,

A mes rapportrices, je suis honorée que vous ayez accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je tiens à vous exprimer toute mon admiration pour vos qualités de scientifiques et ma gratitude pour votre disponibilité et le temps que vous m'avez accordé.

A Robert, mille mercis d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, c'est un réel honneur pour moi. J'ai énormément apprécié nos réunions d'équipes communes le mardi. Chacun de tes commentaires après la présentation de mes résultats ont toujours été bienveillants, constructifs et m'ont été d'une grande aide.

A mon directeur de thèse,

Thierry, je te serai éternellement reconnaissante. Mille mercis pour la confiance que tu m'as accordé en me permettant de rejoindre ton équipe. Tu m'as offert la plus magnifique opportunité de ma vie. Celle de pouvoir m'épanouir, de pouvoir faire un métier qui me passionne, de pouvoir partir au bout du monde pour poursuivre mes rêves. Je n'aurai pu imaginer avoir un meilleur directeur de thèse. Tu m'as accordé une autonomie et une liberté dans mon travail, tout en étant à la fois très présent et à l'écoute. Tu as su me guider avec intelligence et bienveillance. Merci aussi pour ta patience et ta compréhension lorsque j'en ai eu besoin. Je ne pense avoir la chance, au cours de ma carrière, de pouvoir travailler à nouveau avec une personne ayant tes qualités scientifiques et humaines.

A ma mentore, mon amie et la marraine de mon fils,

Ma Meri, tu m'as connu toute jeune étudiante en première année de Master lorsque j'ai rejoint ton équipe, il y a 6 ans ... A ce moment, j'étais déjà persuadée qu'on finirait par retravailler ensemble un jour et c'est toi qui a rejoint mon équipe 2 ans plus tard. Tu es la femme et la scientifique que j'admire le plus. Tellement intelligente, modeste, droite,

généreuse, empathique, affectueuse, enthousiaste, vivante, pétillante, drôle ... Mon affection pour toi n'a fait que grandir ces dernières années. Quel bonheur de te retrouver au labo tous les matins pour notre café au lait, de travailler au bureau juste à côté de toi ou à la paillasse juste en face. Ta bonne humeur quotidienne est si contagieuse ! Au cours de ma thèse, ton aide m'a été tellement précieuse, me conseillant lorsque je rencontrais une difficulté dans mon projet, ou pour la préparation de posters ou de présentations orales, corrigeant mon papier et mon anglais au moindre besoin, m'apprenant les stats ou comment me servir de Prism. J'ai adoré partir en congrès avec toi !!! Je me souviens de notre premier ESPCR à Rennes où nous avons passé notre soirée dans la chambre d'hôtel à me faire répéter avant ma présentation du lendemain car j'étais si stressée. Et de notre deuxième ESPCR à Bruxelles ... beaucoup moins studieux ;) J'ai aussi eu l'impression de te découvrir différemment à l'ESDR de Bordeaux, et j'ai adoré cette Meri !

Au-delà de la science, tu as également été mon plus grand soutien. Présente dans toutes les épreuves que j'ai traversées, ma grossesse compliquée, la naissance prématurée de mon fils et l'accident de mon père. Je ne pourrai jamais te remercier à hauteur de tout ce que tu as fait pour moi et de tout ce que tu représentes. Aujourd'hui tu es bien plus qu'une collègue de labo et plus qu'une amie, tu fais partie de ma famille.

Aux membres de mon équipe,

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de mon équipe. Merci Claire pour m'avoir formé à mon arrivée dans notre toute petite équipe 12. Tu as pris le temps de me montrer et de m'apprendre tout ce que tu savais pour que je puisse débiter mon projet. Mille mercis Marjorie pour ton aide précieuse dans les manip, mais aussi pour tous les moments que l'on a passé ensemble à galérer avec CLEC ;) Une pensée particulière à ma Laulau, la relève. C'est tellement cool depuis que tu as rejoint la team clecette ! Grâce à toi j'ai bu mon premier Armageddon au ChupitoLoco ;) Quelle soirée ! Tu es aussi une jeune femme brillante et je suis persuadée que tu feras une magnifique thèse avec notre Meri ... je suis heureuse de te confier mon bébé CLEC12B, je sais qu'il est entre de bonnes mains ! Hanene, ta présence dans le bureau et le labo est un bonheur ! Si sereine, calme, confiante et intelligente ... je suis sûre que tu auras très bientôt de beaux papiers avec ton nom en premier auteur. A Adri, notre bébé de l'équipe, j'ai été très heureuse de te rencontrer. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta chérie. Ma zaza, je garde en souvenir le Noël du C3M et ton

premier congrès à Bruxelles, c'était génial de faire la fête avec toi ;) Je te souhaite aussi une belle réussite et une très belle thèse !

Aux membres de l'équipe 1,

Corine, timidement au début car tu m'impressionnais beaucoup, j'ai découvert au fil des années, une scientifique brillante mais qui a aussi un grand cœur. Tes conseils et ton aide m'ont beaucoup touché. Yann et Thomas, je vous adore, il me tarde de vous retrouver en congrès ! Chrystel, Nico et Fred, ça a été un plaisir de partager nos cafés du matin et repas du midi avec vous !

A Els et Rana,

Mille mercis à vous 2. Sans votre aide précieuse dans la production de particules virales, je n'aurai jamais eu les outils qui m'ont permis d'obtenir la grande partie de mes résultats. Els, merci pour ton soutien et tes conseils.

A ma famille et mes amis,

A mon mari, Guillaume, l'amour de ma vie et le père de mes deux magnifiques enfants,

Sans toi, je ne serai jamais en train d'écrire ces quelques mots de remerciements pour ma thèse. Depuis notre rencontre, il y a plus de 14 ans déjà... nous avons tout construit ensemble, tout partager. Tu m'as encouragée et soutenue dans la poursuite de mes études, tu m'as permis de surmonter mes doutes et mon manque de confiance, tu m'as donné la force et les moyens de continuer. Tu es mon pilier. Je t'aime.

Dans quelques jours, les enfants et toi allez me suivre au bout du monde, en Australie, pour que je puisse faire mon postdoc. Il me tarde de vivre cette nouvelle aventure tous les 4 !

Sommaire

Liste des abréviations

Table des illustrations

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	22
A. LA PEAU : UN ORGANE A PART ENTIERE	22
1. Généralités	22
2. Structure générale et fonctions	23
a. Les différentes couches de la peau	23
b. La peau : un organe vascularisé	25
c. Le système nerveux cutané.....	25
3. L'épiderme.....	27
4. Origine, distribution et rôles physiologiques des mélanocytes	31
a. Origine embryonnaire	31
b. Gènes impliqués dans le développement du mélanocyte.....	33
c. Organes cibles.....	34
d. Les mélanocytes épidermiques	35
B. LA PIGMENTATION CUTANEE	37
1. La couleur de la peau	37
2. La synthèse des mélanines ou mélanogenèse	39
a. Eumélanogenèse	40
b. Pheomélanogenèse	40
c. Les enzymes de la mélanogenèse.....	41
d. Rapport eumélanine/phéomélanine.....	42
3. Biogenèse et maturation des mélanosomes	44
a. Description des différents stades de maturation	44
b. Origine des mélanosomes.....	45
c. Biogenèse et maturation des mélanosomes	46

4.	<i>Transport et transfert des mélanosomes.....</i>	<i>48</i>
a.	Transport des mélanomes.....	48
b.	La synapse pigmentaire.....	49
c.	Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes.....	50
C.	REGULATION DE LA PIGMENTATION ET VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE.....	52
1.	<i>Effets directs des ultraviolets.....</i>	<i>53</i>
2.	<i>Effets indirects des ultraviolets.....</i>	<i>53</i>
a.	Peptides pro-opiomélanocortiques.....	54
b.	Monoxyde d'azote.....	55
c.	Facteurs de croissance.....	56
d.	L'action des fibroblastes.....	57
e.	Le rôle du système immunitaire.....	58
3.	<i>Voies de signalisation intracellulaires et rôle de MITF.....</i>	<i>59</i>
a.	Voies de signalisations.....	59
a.	MITF.....	60
b.	Régulation de MITF.....	61
D.	CLEC12B : UN RECEPTEUR CTLR.....	66
1.	<i>CTLRs.....</i>	<i>66</i>
a.	Classification et structure.....	66
b.	Ligands et fonctions biologiques.....	67
c.	Potentiel thérapeutique des CTLRs.....	67
2.	<i>Le cluster de gènes Dectin-1.....</i>	<i>70</i>
3.	<i>Récepteurs à domaine ITAM.....</i>	<i>71</i>
a.	Motif ITAM et signalisation.....	71
a.	CLEC7A (Dectin1).....	73
b.	CLEC2.....	74
c.	CLEC9A.....	75
4.	<i>Récepteurs à domaine ITIM.....</i>	<i>76</i>
a.	Identification du motif ITIM.....	76
b.	Motif ITIM et signalisation.....	79
c.	CLEC12A.....	79
5.	<i>CLEC12B.....</i>	<i>83</i>

a.	Structure	83
b.	Identification et fonction.....	83
E.	PHOSPHATASES ET SIGNALISATION INTRA-CELLULAIRE.....	87
1.	<i>La tyrosine phosphatase SHP1</i>	87
a.	Identification.....	87
b.	Structure, modes de reconnaissance et d'activation.....	89
c.	Substrats de SHP-1	92
d.	Mutations de SHP1 et pigmentation	95
2.	<i>La tyrosine phosphatase SHP2</i>	97
a.	Structure, modes de reconnaissance et d'activation.....	97
b.	Substrats et rôle dans la signalisation cellulaire	99
c.	Pathogenèse du syndrome LEOPARD	104
II.	PRESENTATION DU PROJET DE THESE.....	110
A.	CONTEXTE GENERAL ET HYPOTHESE DE TRAVAIL	110
B.	OBJECTIFS	111
III.	RESULTATS	113
	PREMIER ARTICLE (EN REVISIONS DANS JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION)	113
	<i>CLEC12B</i> : A NEW GENE REGULATING THE COLOR OF SKIN	113
	DEUXIEME ARTICLE (EN REVISIONS DANS JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION) : <i>CLEC12B</i> IS A TUMOR-SUPPRESSOR GENE IN MELANOMA THAT REGULATES STAT ACTIVATION	152
IV.	DISCUSSION.....	196
	PREMIER ARTICLE (EN REVISION DANS JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION)	196
	<i>CLEC12B</i> : A NEW GENE REGULATING THE COLOR OF SKIN	196
	<i>Étude descriptive de CLEC12B dans la peau humaine</i>	197
	CLEC12B : un CTLR exprimé par les mélanocytes	197
	L'expression de CLEC12B dans la peau normale est influencée par le phototype	199
	<i>Analyse fonctionnelle de CLEC12B</i>	200
	CLEC12B module la synthèse de mélanine dans les mélanocytes humains normaux en culture.....	200
	CLEC12B module la pigmentation dans un modèle d'épiderme reconstruit.....	201
	<i>Étude des mécanismes moléculaires impliqués</i>	202

CLEC12B régule l'expression des enzymes de la mélanogenèse (TYR, TYRP1 et DCT), ainsi que leur régulateur transcriptionnel MITF.....	202
CLEC12B induit la dégradation protéasomale de CREB.....	202
CLEC12B régule la mélanogenèse via le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2	203
Hypothèses sur les mécanismes de signalisation impliqués.....	206
DEUXIEME ARTICLE (EN REVISION DANS JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION) : CLEC12B IS A TUMOR-SUPPRESSOR GENE IN MELANOMA THAT REGULATES STAT ACTIVATION	210
V. PERSPECTIVES	212
VI. CONCLUSION	217
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	219
VIII. ANNEXES	240
A. PUBLICATIONS ISSUES DE COLLABORATIONS.....	240
B. POSTERS ET COMMUNICATIONS ORALES	285
1. <i>Posters</i>	285
2. <i>Communications orales</i>	287
C. ENCADREMENT D'ETUDIANTS.....	287

Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
ACTH	Adrenocorticotrop hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Serine/threonine-protein kinase
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
AOC	Albinismes oculo-cutanés
AP-3	Adaptor protein-3
APC	Cellules présentatrices d'antigène
BCR	B cell receptor
CAV1	Cavelolin 1
CCN	Cellules de la crête neurale
CCR	Carcinomes à cellules rénales
CD	CysteinylDOPA
CHS	Chediak-Higashi Syndrom
CLEC	C-type lectin
CMV	Corps multi-vésiculaires
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CRD	Carbohydrate recognition domain
CRE	cAMP response element
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CSK	C-terminal SRC Kinase
CTLD	C-Type Lectin-like Domain
CTLR	C-Type Lectin Receptors
CTNS	Cystinosine
DC	Dendritic cell
DCT	DOPAchrome tautomerase
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule
Dectin-1	Dendritic-cell-associated C-type lectin-1
DHI	5,6-dihydroxynindole
DHICA	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acide
DKK1	Dickkopf 1
DOPA	Dihydroxyphénylalanine
DQ	DOPAquinone
EDN3	Endotheline 3
EDNRB	Récepteur de l'endothéline B
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ET-1	Endothéline-1

FcR	Fc receptors
FGF2	Fibroblast growth factor
Foxd3	Forkhead-box transcription factor D3
GMPc	Acide guanosine monophosphorique cyclique
GPS	Griscelli-Prunieras Syndrom
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GWAS	Genome Wide Association Study
Hchp	Hematopoietic Cell Phosphatase
HGF	Hepatocyte growth factor
HMG	High mobility group)
HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JAK	Janus kinase
KGFR	Keratinocyte growth factor receptor
KIR	Killer cell Ig superfamily receptors
LDL	Low-density lipoprotein
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor-1
LRO	Lysosomal related organelles
LS	LEOPARD syndrom
LT	Lymhocyte T
LTh	Lymhocyte T helper
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBL	Mannose-binding lectin
MC1R	MelanoCortin 1 Receptor
MINCLE	Macrophage-inducible C-type lectin
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MLPH	Mélanophiline
α -MSH	α -Melanocyte-stimulating hormone
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T activées
NK	Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
NRG1	Neuregulin-1
NTR	N-terminale
PAR-2	Protease-activated receptors
PAX3	Paired box gene 3
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PKA	Protéine kinase A
PKD	Polycystic kidney disease
Pmel17	Premelanosome protein 17
POMC	Pro-opiomélanocortine
PKA	Protéine kinase A
PMEL17	Premelanosome protein
<i>PTPN6</i>	Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor type 6
SCF	Stem cell factor
SH2	Src homology 2
SHIP	Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
SL	Syndrome LEOPARD
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOX9	SRY-related high-mobility group box 9
SOX10	SRY-related high-mobility group box 10
Sry	Sex-determining Region of Y chromosome
Syk	Spleen tyrosine kinase
TCF	T cell factor
TCR	T cell receptor
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TLR	Toll like receptor
TN	Tube neural
TYR	Tyrosinase
TYRP1	TYR-related protein-1
UEM	Unité épidermique de mélanisation
USF1	Upstream stimulatory factor 1
UV	Ultra-violet
WS	Waardenburg Syndrom

Table des illustrations

FIGURE 1 ULTRASTRUCTURE DE LA PEAU (D'APRES : NCBI BOOKSHELF. A SERVICE OF THE NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH) MONTRANT LES DIFFERENTES COUCHES QUI LA COMPOSENT, SA VASCULARISATION, SON INNERVATION ET SES ANNEXES.....	23
FIGURE 2 L'INNERVATION DE LA PEAU. (D'APRES HTTP://SAGASCIENCE.CNRS.FR).....	26
FIGURE 3 LES QUATRE POPULATIONS CELLULAIRES DE L'EPIDERME.....	27
FIGURE 4 LES DIFFERENTES COUCHES DE KERATINOCYTES ET LEUR ULTRASTRUCTURE. (D'APRES HTTPS://FR.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/ÉPIDERME_ANATOMIE)	28
FIGURE 5 : LES DEUX VAGUES DE DEVELOPPEMENT DES MELANOCYTES CHEZ LA SOURIS (ADAPTÉ DE BONAVENTURE ET AL., 2013). LES CELLULES DES CRETES NEURALES DONNENT NAISSANCE AUX MÉLANOBLASTES PRÉCURSEURS (ROUGES) QUI VONT ENTRER DANS LA MSA (MIGRATING STAGING AREA). LES MÉLANOBLASTES (VERT) VONT ENSUITE MIGRER DORSO-LATÉRALEMENT (FLÈCHE VERTE) ENTRE LES SOMITES (ORANGE) ET L'ECTODERME (TRAIT NOIR). ILS VONT ENSUITE ATTEINDRE LA PEAU (BRUN) ET SE DIFFÉRENCIER EN MÉLANOCYTES (NOIR). CE PROCESSUS CORRESPOND À LA PREMIÈRE VAGUE DU DÉVELOPPEMENT DES MÉLANOCYTES (FLÈCHE VERTE). LES CELLULES DES CRÊTES NEURALES VONT DONNER NAISSANCE AUX CELLULES PRÉCURSEURS DE SCHWANN (ROUGE) LOCALISÉES SUR LES NERFS (TRAIT NOIR). CES SCP VONT FORMER SOIT DES CELLULES DE SCHWANN (BLEU), SOIT DES MÉLANOBLASTES (VERT) QUI SE DÉTACHENT DES NERFS ET MIGRENT VERS L'ÉPIDERME (BRUN). UNE FOIS DANS L'ÉPIDERME, LES MÉLANOBLASTES VONT SE DIFFERENCIER EN MELANOCYTES (NOIR). LA FORMATION DE MELANOCYTES DEPUIS LES SCP EST APPELEE SECONDE VAGUE (FLÈCHE ROUGE).....	32
FIGURE 6 LES DIFFERENTES LOCALISATIONS ET FONCTIONS DES MELANOCYTES DANS L'ORGANISME (D'APRES PLONKA ET AL., 2009). DES MELANOCYTES PEUVENT SE TROUVER DANS LE CŒUR, L'OREILLE INTERNE, LES TISSUS ADIPEUX, L'ŒIL, L'EPIDERME OU LE FOLLICULE PILEUX ET AVOIR DES FONCTIONS DIFFERENTES EN FONCTION DE LEUR LOCALISATION.	34
FIGURE 7 L'UNITE EPIDERMIQUE DE MELANISATION.....	35
FIGURE 8 LES DIFFERENTS PHOTOTYPES : CLASSIFICATION DE FITZPATRICK.....	37

FIGURE 9 LES VOIES DE BIOSYNTHESE DE L'EUMELANINE ET DE LA PHEOMELANINE.(D'APRES KONDO T. AND HEARING VJ., 2011)	39
FIGURE 10 PHENOTYPES CORRESPONDANTS AUX MUTATIONS DES GENES TYR (LOCUS ALBINO), TYRP1 (LOCUS BROWN) ET DCT (LOCUS SLATY) CHEZ LA SOURIS. (D'APRES MURISIER F. ET AL., 2006).....	41
FIGURE 11 ROLE DU RECEPTEUR MC1R ET DE LA PROTEINE AGOUTI DANS LE DETERMINISME DE LA SYNTHESE D'EUMELANINE ET DE PHEOMELANINE. CHEZ LA SOURIS LE GENE AGOUTI DETERMINE SA COULEUR DE PELAGE JAUNE ORANGE.	43
FIGURE 12 DIFFERENTS STADES DE MATURATION DU MELANOSOME OBSERVES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. (ADAPTE D'APRES DELEVOYE C. ET AL., 2011)	45
FIGURE 13 LA VOIE D'ENDOCYTOSE ET LA BIOGENESE DES MELANOSOMES. (D'APRES RAPOSO G. ET AL., 2007) LES MELANOSOMES PROVIENNENT DE LA VOIE D'ENDOCYTOSE ET RESTENT DISTINCTS DES LYSOSOMES. LA PROTEINE PMEL17 TRANSITE PAR LES ENDOSOMES PRECOCES AFIN DE GENERER LES FIBRES INTRALUMINALES CARACTERISTIQUES DES PREMELANOSOMES DE STADE II. LES ENZYMES TYROSINASE ET TYRP1, SONT ADRESSEES DEPUIS LES INTERMEDIAIRES ENDOSOMIAUX AUX MELANOSOMES EN COURS DE MATURATION (STADES II ET III) GRACE AUX ADAPTATEURS AP-1 ET AP-3 AINSI QU'AUX COMPLEXES BLOC. LES MELANOSOMES MATURES SONT TRANSPORTES GRACE AU RESEAU DE MICROTUBULES VERS L'EXTREMITE DES DENDRITES AVANT D'ETRE TRANSFERES AUX KERATINOCYTES.....	47
FIGURE 14 TRANSPORT DES MELANOSOMES. (D'APRES SOLDATI AND SCHLIWA, 2006).....	49
FIGURE 15 MODELE HYPOTHETIQUE DE LA SYNAPSE PIGMENTAIRE. (D'APRES VAN DEN BOSSCHE ET AL., 2006)	50
FIGURE 16 LES DIFFERENTS MECANISMES POSSIBLES DE TRANSFERT DES MELANOSOMES AUX KERATINOCYTES. (D'APRES WU ET HAMMER, 2014)	51
FIGURE 17 PRINCIPALES FACTEURS ET VOIES DE SIGNALISATION REGULANT LA FONCTION MELANOCYTAIRE DANS LA PEAU. (D'APRES KONDO T. ET HEARING VJ., 2011). LES ANTAGONISTES DES RECEPTEURS MC1R ET LRP SONT EN ROUGE (ASP ET DKK1).....	54
FIGURE 18 ROLE CENTRAL DE MITF QUI CONTROLE L'EXPRESSION DE NOMBREUX GENES IMPLIQUES DANS LA FONCTION PIGMENTAIRE DU MELANOCYTE. (D'APRES CHELI Y. ET AL., 2009)	60
FIGURE 19 REGULATION DE MITF PAR PAX3 ET SOX10. (D'APRES WAN P., ET AL., 2011). PAX3 ET SOX10 SE LIENT AU PROMOTEUR DU GENE MITF ET ACTIVENT ENSEMBLE SON EXPRESSION. SIMULTANEMENT, PAX3 SE LIE SUR LES SEQUENCES PROMOTRICES DES GENES CIBLES DE MITF (TYR, TYRP1 ET DCT) EMPECHANT MITF DE S'Y LIER ET D'ACTIVER LEUR TRANSCRIPTION.....	62
FIGURE 20 REGULATION DE MITF PAR CREB (D'APRES WAN P. ET AL., 2011)	63

FIGURE 21 ROLE DE SOX9 DANS LA REGULATION DE MITF. (D'APRES D'MELLO S. ET AL., 2016)	64
FIGURE 22 CLASSIFICATION DES CTLR, D'APRES IMPERIAL COLLEGE LONDON C-TYPE LECTINS.....	66
FIGURE 23 POTENTIEL THERAPEUTIQUE DES CTLRS. (D'APRES GORDON D. BROWN ET AL., 2018).....	69
FIGURE 24 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES GENES APPARTENANT AU DECTIN-1 CLUSTER SITUE SUR LE CHROMOSOME HUMAIN 12.	70
FIGURE 25 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CTLRS APPARTENANT AU DECTIN-1 CLUSTER. (D'APRES PLATO A. ET AL., 201).....	71
FIGURE 26 MOTIF ITAM ET SIGNALISATION SYK. (FIGURE ADAPTE A PARTIR DE « THE SYK TYROSINE KINASE : A CRUCIAL PLAYER IN DIVERSE BIOLOGICAL FUNCTIONS » MOSCAI ET AL.,2010).....	72
FIGURE 27 SEQUENCE CONSENSUS DU MOTIF ITIM PERMETTANT LA LIAISON AU DOMAINE SH2 DES PHOSPHATASES SHIP, SHP1 OU SHP2. (D'APRES SWEENEY MC. ET AL., 2005)	78
FIGURE 28. STRUCTURE GENOMIQUE ET DIFFERENTS ISOFORMES DE CLEC12A. (D'APRES MARSHALL ASJ., ET AL., 2004)	80
FIGURE 29 SIGNALISATION DE CLEC12A VIA SON DOMAINE ITIM ET LE RECRUTEMENT DES PHOSPHATASES SHP1 ET SHP2. (D'APRES PLATO A. ET AL., 2013)	82
FIGURE 30 ALIGNEMENT DES SEQUENCES HUMAINE ET MURINE PREDICTIVES DE CLEC12B AVEC LES RECEPTEURS CTLR CLEC12A, CLEC1B, CLEC9A, CLEC1A, CD94 ET NKG2D. LES ASTERISKS INDIQUENT LES ACIDES AMINES IDENTIQUES DANS LE DOMAINE CTL. LES DOMAINES INTRACELLULAIRE ITIM, TRANSMEMBRANAIRE AINSI QUE LE TIGE (STALK REGION) SONT INDIQUES.....	84
FIGURE 31 ANALYSE PCR DE L'EXPRESSION DE CLEC12B DANS DIVERS TISSUS HUMAINS.	85
FIGURE 32 CLEC12B RECRUTE SHP1 ET SHP2 VIA SON DOMAINE ITIM.....	86
FIGURE 33 CONFORMATION ET ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA PHOSPHATASE SHP1.	91
FIGURE 34 A-C LA PRESENCE OU L'ABSENCE DE L'ALLELE ME N'A PAS DE CONSEQUENCE EVIDENTE SUR LES EFFETS DU LOCUS C-KIT SUR LE PHENOTYPE DE COULEUR DU PELAGE. D COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE SHP1 DANS DES MELANOCYTES PRIMAIRES EN CULTURE ET DES CELLULES LSTRA QUI EXPRIMENT UNE GRANDE QUANTITE DE SHP1. (D'APRES LORENZ U. ET AL., 1996).....	97
FIGURE 35 LES PHOSPHATASES SHP1 ET SHP2 PARTAGENT 60% D'IDENTITE DE SEQUENCE.....	97
FIGURE 36 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU ROLE DES MUTATIONS DE SHP2 ASSOCIEES AU SL DANS LA SYNTHESE DE MELANINE. (D'APRES MOTEGI ET AL., 2015).....	108

FIGURE 37 LA SUREXPRESSION DE CLEC12B DANS LES MELANOCYTES HUMAINS NORMAUX ENTRAINÉ L'ACTIVATION DE LA
MAPK ERK.....207

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. La peau : un organe à part entière

1. Généralités

La peau est ce que l'on appelle un tégument (du latin *tegumentum* qui signifie couverture). Plus qu'une simple enveloppe ou membrane inerte, la peau est un tissu vivant, un organe à part entière, un organe frontière essentiel à la protection du corps face aux agressions de l'environnement, un organe de contact sensoriel et d'échanges thermiques, hydriques, nécessaires au maintien de l'homéostasie. Elle a un rôle actif dans de nombreux processus biologiques et biochimiques. Organe le plus étendu de notre corps, sa surface chez l'adulte est comprise entre 1,5 et 2 mètres carrés. Son poids total se situe entre 2 et 3 kilogrammes. Très variable, son épaisseur varie de 0,5 millimètre au niveau des paupières, à 4 ou 5 millimètres en haut du dos.

Sa couleur, sa fermeté et son aspect sont support de notre identité, révélant ainsi notre âge et nos origines ethniques. Véritable interface d'expression de pathologies et de réactions aux modifications de l'environnement, la peau informe sur notre état de santé. Également reflet de nos émotions, elle participe à la communication sociale. "Ce qu'il y a de plus profond dans l'homme, c'est la peau" écrivait Paul Valéry. Bien malgré nous, notre épiderme révèle nos maux physiques et psychiques.

2. Structure générale et fonctions

a. Les différentes couches de la peau

La peau humaine est un organe complexe constitué de trois couches tissulaires principales superposées, de la plus profonde à la plus superficielle : l'hypoderme (du grec « hypo », en dessous et « derma », la peau), le derme et l'épiderme (du grec « epi », dessus) séparés par la jonction dermo-épidermique. (Figure 1)

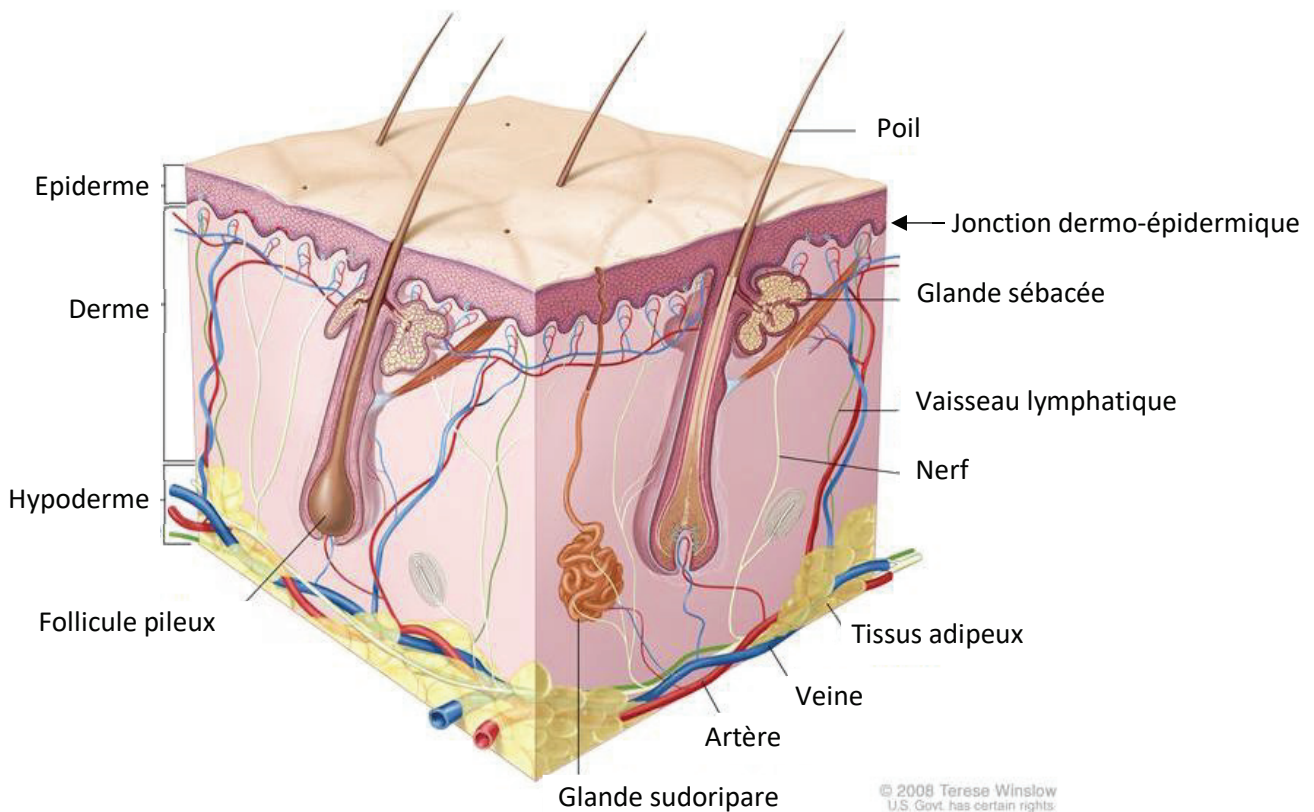


Figure 1 Ultrastructure de la peau (D'après : NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health) montrant les différentes couches qui la composent, sa vascularisation, son innervation et ses annexes.

- **L'épiderme** est un épithélium de revêtement. C'est la couche la plus superficielle de la peau, en contact direct avec le milieu extérieur. D'une très faible épaisseur, en moyenne 100µm, sa fonction essentielle est pourtant d'assurer la protection de

l'organisme tout entier contre les agressions. L'épiderme est rattaché au derme par la jonction dermo-épidermique.

- **Le derme** est un tissu de soutien (tissu conjonctif) dont l'épaisseur est variable selon les régions du corps, pouvant atteindre jusqu'à 1 à 3 mm. Richement vascularisé, il assure la nutrition de l'épiderme par diffusion. Ses fibres protéiques (fibres de collagène et fibres élastiques) produites par des cellules spécifiques, les fibroblastes, jouent un rôle d'assise pour l'épiderme. La perte des capacités de soutien et d'élasticité des fibres du derme est à l'origine de l'apparition des rides et autres signes cutanés du vieillissement.

Le derme joue aussi un rôle primordial dans la thermorégulation, la cicatrisation et l'élimination de certaines substances toxiques par les phénomènes de sudation. C'est, en effet, au sein du derme que sont situées les glandes sudoripares.

- **L'hypoderme** est la couche de tissu immédiatement située sous le derme de la peau. C'est un tissu conjonctif lâche, richement vascularisé, qui contient selon les endroits plus ou moins de tissu adipeux. Il sert d'interface entre le derme et les structures mobiles situées en dessous de lui comme les muscles et les tendons. Il protège également l'organisme des chocs physiques, des variations de température et sert de réserve adipeuse. Il a une épaisseur variable selon les localisations ; elle est mince au front et épaisse au niveau des zones devant supporter un impact telles que les fesses ou les talons.
- **Les annexes cutanées** comprennent les glandes sudoripares (qui excrètent la sueur), les glandes sébacées (qui excrètent le sébum) et phanères (du grec « phaneros » qui signifie apparent) que sont les poils et les ongles.

b. La peau : un organe vascularisé

Le derme et l'hypoderme sont richement vascularisés. Comme dans la circulation sanguine générale, il existe un réseau artériel et un réseau veineux. Le réseau artériel dermique est un réseau sous papillaire avec des artérioles de petit calibre, destinées aux papilles dermiques. Il véhicule le sang oxygéné. Le réseau veineux dermique est un réseau sous papillaire avec des veinules qui partent des papilles dermiques et qui véhiculent le sang dépourvu d'oxygène. Entre ces deux réseaux, il existe des connexions appelées «anastomoses artério-veinulaires» qui jouent notamment un rôle dans la thermorégulation. Plusieurs millions de plexus veineux-capillaires sous-épithéliaux (entrelacement entre les veines et les capillaires) et de vaisseaux de transfert, situés plus profondément dans le derme, permettent les échanges métaboliques et de facteurs de croissance avec l'épiderme et les annexes pilo-sébacées et sudoripares. Très développée, la vascularisation cutanée excède largement les seuls besoins nutritifs locaux. Elle est également impliquée dans la thermorégulation, la cicatrisation, les réponses immunitaires et le contrôle de la pression sanguine de l'organisme en entier. Un réseau lymphatique superficiel est aussi présent sur tout le revêtement cutané. Les vaisseaux lymphatiques assurent le transport des cellules immunitaires et participent ainsi à la défense contre les agressions microbiennes. Ils interviennent également dans la préservation de l'équilibre hydrique de l'organisme et assurent une fonction de drainage des produits du métabolisme cellulaire.

c. Le système nerveux cutané

La peau est en contact direct avec le milieu extérieur et représente un organe sensoriel majeur de l'organisme. Le système nerveux cutané, reçoit et répond à toute une

variété de stimuli qu'ils soient : physiques, chimiques, électriques ou thermiques. Il reçoit les informations en provenance du système nerveux central et transmet les informations sur l'environnement en retour. Les nerfs cutanés peuvent moduler un grand nombre de fonctions au sein de la peau, telles que : la vasomotricité, la fonction barrière (hydrique, physique, anti-oxydante et photo-protectrice), la thermorégulation, l'érection pileaire, la sécrétion des glandes, la croissance et la différenciation des tissus, la cicatrisation ou encore la réponse immunitaire. Il existe une relation étroite entre les fibres nerveuses et les cellules cutanées qui forment, avec le système immunitaire, le système neuro-endocrino-immuno-cutané. Le système nerveux cutané se compose, pour une minorité, de fibres nerveuses autonome (motrices et sécrétrices) qui joue un rôle crucial dans la régulation de la fonction des glandes sudoripares, la vasomotricité, le flux sanguin et la thermorégulation et de fibres nerveuses sensorielles. Les terminaisons nerveuses de ces fibres sont de deux types : libres ou spécialisées (corpuscules de Pacini, de Meissner, de Krause et de Ruffini, disque de Merkel) au sein de la peau. (Figure 2)

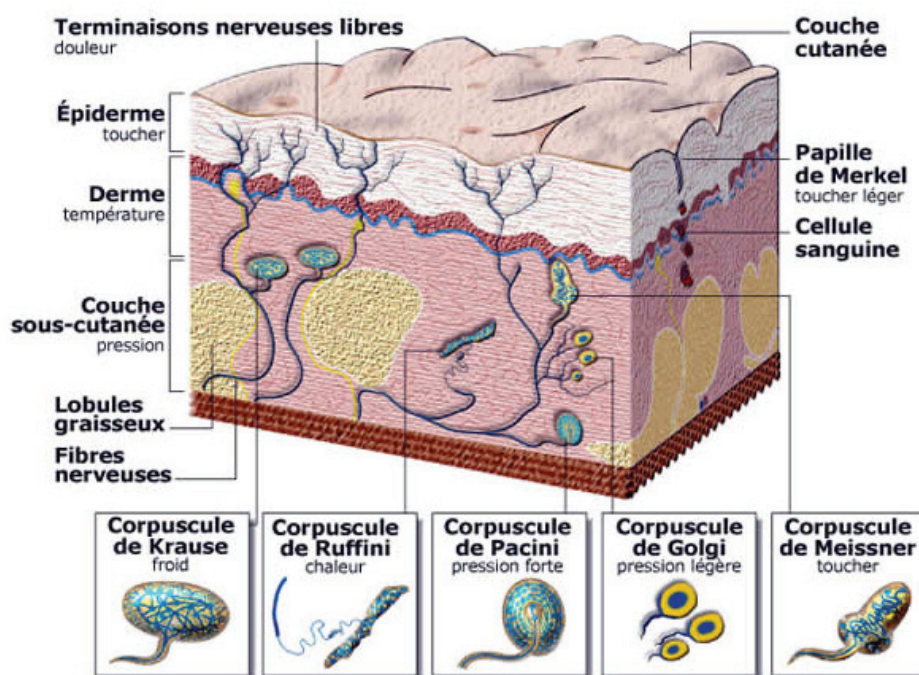


Figure 2 L'innervation de la peau. (D'après <http://sagascience.cnrs.fr>)

Elles sont sensibles à la pression, à l'étirement, à la vibration, à la température ou à la douleur. La répartition de ces fibres sensorielles dépend de la partie du corps. La sensation de tact (sensation provoquée par des actions mécaniques de contact, de choc, de pression, de traction qui sont exercées sur la peau) se localise plus spécialement au bout des doigts, dans la paume des mains, sur les lèvres, sur la plante des pieds et aux organes génitaux (Gros, 2017).

3. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié (constitué de plusieurs assises cellulaires), pavimenteux (les cellules de sa couche superficielle sont plates) et kératinisé (il synthétise une protéine particulière : la kératine).

L'épiderme est constitué de plusieurs couches cellulaires dans lesquelles on retrouve 4 types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. (Figure 3)

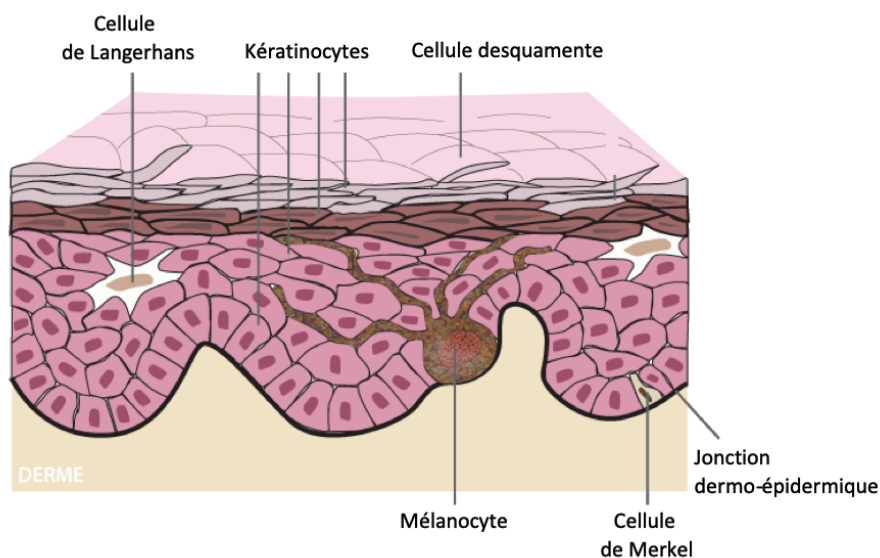


Figure 3 Les quatre populations cellulaires de l'épiderme.

Les Kératinocytes (du grec « keras » qui signifie corne) sont les cellules les plus nombreuses puisqu'elles représentent 80% de la population cellulaire de l'épiderme. Leur principale caractéristique est leur capacité à se différencier en produisant une protéine fibreuse et hydrophobe : la kératine. Ce processus, appelé la kératinisation, confère à l'épiderme son rôle de protection par un effet « barrière ».

Les kératinocytes forment 4 couches superposées caractérisées par leur stade de différenciation. (Figure 4)

On distingue, de la profondeur vers la surface :

- La couche basale également couche germinative ou *stratum basal* qui est en contact avec la jonction dermo-épidermique ;
- La couche épineuse ou *stratum spinosum* ;
- La couche granuleuse ou *stratum granulosum* ;
- La couche cornée ou *stratum corneum*.

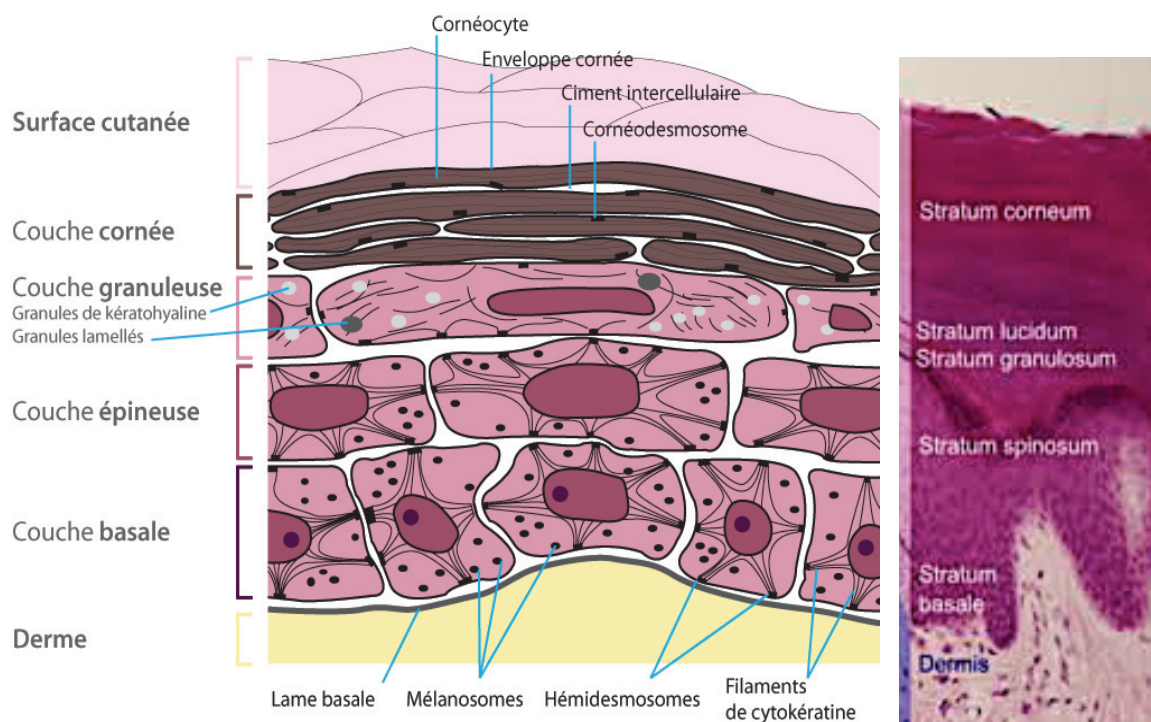


Figure 4 Les différentes couches de kératinocytes et leur ultrastructure. (D'après https://fr.wikipedia.org/wiki/Épiderme_anatomie)

La différenciation des kératinocytes se fait de façon centrifuge. Au fur et à mesure qu'elles migrent et s'éloignent de la jonction dermo-épidermique, les cellules subissent des modifications biochimiques et structurales dont la plus importante est la kératinisation. Elles évoluent ainsi de kératinocytes basaux en kératinocytes cornés. (*Figure 4*)

La couche basale est une couche monocellulaire de cellules cylindriques, implantées sur la jonction dermo-épidermique. Elle est également appelée couche germinative car l'activité mitotique des kératinocytes y est très intense, jouant un rôle fondamental dans la régénération épidermique. Le cytoplasme des kératinocytes de cette couche est riche en organites cellulaires et en mélanosomes. Ces derniers, produits par les mélanocytes voisins, sont transférés aux kératinocytes pour se concentrer autour du noyau afin de protéger l'ADN des effets délétères des rayons ultra-violet (détaillé plus loin).

La couche épineuse contient des cellules de forme polygonale, rattachées les unes aux autres par un grand nombre de desmosomes qui, leur donnent une allure épineuse en observation histologique. Ces attaches desmosomiales assurent une grande cohésion entre les cellules et sont responsables, en partie, de la grande résistance mécanique de cette couche cellulaire.

La couche granuleuse est constituée de 3 couches de kératinocytes aplatis dans lesquels on retrouve des granulations de kératohyaline ainsi que des kératinosomes ou corps lamellaires d'Odland.

La couche cornée est constituée, suivant la localisation, de 4 à 20 couches de cellules aplaties complètement kératinisées. Ces kératinocytes ne possèdent plus de noyau ni d'organites cytoplasmiques. Ils sont alors appelés : cornéocytes. En surface, les cellules finissent par se détacher et s'éliminer environ toutes les 3 semaines. C'est le

processus de desquamation. Chaque cornéocyte desquamé est remplacé par un kératinocytes nouvellement synthétisé au niveau de la couche basale.

Les cellules de Langerhans sont localisées dans la couche basale et épineuse de l'épiderme. Elles ne constituent que 2 à 5 % de la population cellulaire mais couvrent la totalité de la surface épidermique. Ce sont les cellules dendritiques du système immunitaire de la peau. Elles possèdent plusieurs types de récepteurs capables de reconnaître des antigènes :

- La langéline (aussi appelé CD207 ou CLEC4k) qui est un récepteur de type lectine reconnaissant des antigènes glycolipidiques.
- La dectin-1, qui est également un récepteur de type lectine qui reconnaît et internalise les β -glucanes.
- Des récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines G et E (IgG et IgE)
- Des récepteurs TLR (acronyme de l'anglais « toll-like receptor ») qui reconnaissent des motifs moléculaires et transmettent un signal de danger.

Elles sont donc spécialisées dans la capture, le transport et la présentation des antigènes aux lymphocytes T des ganglions lymphatiques.

Les cellules de Merkel constituent la population minoritaire de l'épiderme. On les retrouve principalement dans la couche basale. Ce sont des cellules neuroendocrines qui produisent des neuromédiateurs. Elles jouent également le rôle de mécanorécepteurs et sont responsables de la fonction de tact.

Les mélanocytes représentent 5% de la population cellulaire épidermique. Ils sont localisés à la jonction dermo-épidermique ainsi que dans les follicules pileux. Les mélanocytes produisent des mélanines, pigments qui leur confèrent un rôle essentiel dans la photo-protection contre les rayons ultra-violets et qui sont responsables de la pigmentation cutanée (Cf. chapitre suivant).

4. Origine, distribution et rôles physiologiques des mélanocytes

a. Origine embryonnaire

Les mélanocytes proviennent de la différenciation de cellules progénitrices provenant de la crête neurale appelées : mélanoblastes. Les précurseurs des cellules de la crête neurale (CCN) se trouvent en bordure de l'ectoderme neural (ou plaque neurale), à la frontière avec l'ectoderme non neural. Le neuroectoderme générera notamment le système nerveux central et l'ectoderme non neural formera l'épiderme. Lors de la neurulation, les bordures de la plaque neurale fusionnent pour former le tube neural (TN). Les CCN naissent à la jonction entre le TN et l'ectoderme non neural. Une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permet aux CCN d'émerger du TN et de migrer dans l'embryon par vagues successives, colonisant différentes parties de l'organisme et donnant naissance à différents lignages cellulaires (Duband JL. *et al.*, 2006, 2010). Selon leur trajectoire de migration, les CCN seront à l'origine : des neurones et de la glie du système nerveux sensoriel périphérique et autonome (ganglion parasympathique, entérique, sensoriel), des cellules neuroendocrines, des cellules de Schwann du système nerveux périphérique (ganglion sympathique), des cellules pigmentaires (mélanocytes), des os et du cartilage de la face (méssectoderme) (Le Douarin *et al.*, 2004).

Deux types de migration s'offrent aux CCN :

- la migration dorso-ventrale, entre les somites et le tube neural ;
- la migration dorso-latérale, entre le dermomoyotome et l'ectoderme.

Les cellules neuronales et gliales, notamment les cellules de Schwann, migrent dorso-ventralement, alors que les mélanoblastes effectuent une migration dorso-latérale pour rejoindre l'épiderme afin de se différencier en mélanocytes (Larue *et al.*, 2013).

Cependant, des études ont montré qu'une fraction des mélanocytes de la peau provient également des précurseurs des cellules de Schwann issus des CCN migrant ventralement. Ces précurseurs multipotents peuvent donner soit des cellules de Schwann qui forment la gaine de myéline, soit des mélanocytes (Adameyko *et al.*, 2009 ; Budi *et al.*, 2011).

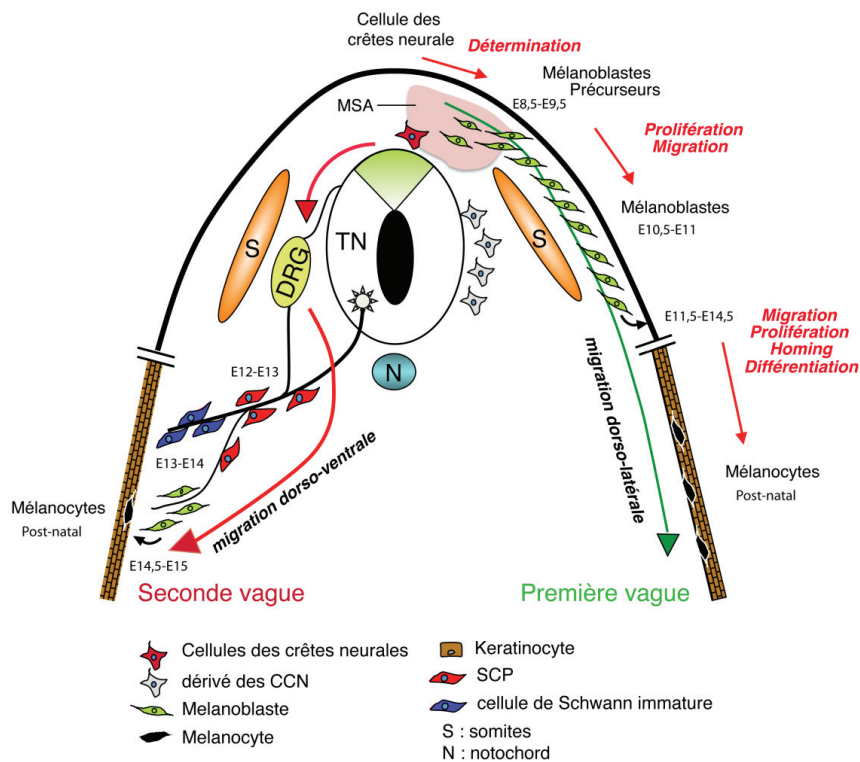


Figure 5 : Les deux vagues de développement des mélanocytes chez la souris (adapté de Bonaventure *et al.*, 2013). Les cellules des crêtes neurales donnent naissance aux mélanoblastes précurseurs (rouges) qui vont entrer dans la MSA (Migrating staging area). Les mélanoblastes (vert) vont ensuite migrer dorso-latéralement (flèche verte) entre les somites (orange) et l'ectoderme (trait noir). Ils vont ensuite atteindre la peau (brun) et se différencier en mélanocytes (noir). Ce processus correspond à la première vague du développement des mélanocytes (flèche verte). Les cellules des crêtes neurales vont donner naissance aux cellules précurseurs de Schwann (rouge) localisées sur les nerfs (trait noir). Ces SCP vont former soit des cellules de Schwann (bleu), soit des mélanoblastes (vert) qui se détachent des nerfs et migrent vers l'épiderme (brun). Une fois dans l'épiderme, les mélanoblastes vont se différencier en mélanocytes (noir). La formation de mélanocytes depuis les SCP est appelée seconde vague (flèche rouge).

b. Gènes impliqués dans le développement du mélanocyte

Durant l'embryogenèse, les cellules de la crête neurale sont soumises à une cascade de signaux moléculaires. Ces signaux sont responsables de l'activation de la transcription d'un réseau de gènes cibles déterminant le destin mélanocytaire mais également la migration, la prolifération et la survie des mélanoblastes.

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) est un facteur de transcription considéré comme le « gène maître » du lignage mélanocytaire (Bertolotto, 1998 ; Goding et al., 2000). L'isoforme M-MITF de ce gène va spécifiquement activer des gènes essentiels à la différenciation du mélanocyte, en particulier *DCT*, *TYR* et *TYRP1*, tout en inhibant des gènes exprimés par les CCN comme les facteurs de transcription *SOX9* (SRY-related high-mobility group box 9), *SLUG* et *FOXD3* (Forkhead-box transcription factor D3) (Adameyko et al., 2012 ; Mort et al., 2015).

KIT est un récepteur tyrosine kinase considéré comme l'un des marqueurs précoces du lignage mélanocytaire. Il est exprimé en même temps que M-MITF, dès le stade des mélanoblastes précurseurs émergeant du TN. (Opdecamp et al., 1997 ; Wehrle-Haller, 2003). KIT et MITF se co-régulent et MITF est nécessaire à la maintenance de l'expression de KIT dans les mélanoblastes. MITF ainsi que KIT, qui est situé à la surface des mélanocytes (C-KIT) et son ligand (le SCF « Stem cell factor ») produit par les kératinocytes, sont également impliqués dans la migration, la survie, la prolifération et la différenciation des mélanoblastes.

PAX3 (Paired box gene 3) et **SOX10** (SRY-related high-mobility group box 10) jouent un rôle clé dans la différenciation mélanocytaire. PAX3 est un facteur de transcription exprimé par les CCN (Goulding et al., 1991). Il est capable d'activer la transcription de M-MITF en coopération avec SOX10.

Enfin, le produit du gène **SLUG** (un facteur de transcription exprimé par les cellules de la crête neurale, y compris par les mélanoblastes) mais aussi le récepteur de l'endothéline B (**EDNRB**), et son ligand, l'endothéline 3 (**EDN3**) semblent intervenir dans la différenciation et la survie mélanocytaire au cours de l'embryogenèse.

La signalisation **WNT** joue, elle aussi, un rôle critique dans le développement des mélanocytes. **WNT1** et **WNT3a** sont impliqués dans la différenciation des cellules de la crête neurale en mélanocytes (Dorsky Rl. *et al.*, 1998). De plus, **WNT3a** agit sur les mélanoblastes pour maintenir l'expression de **MITF** et favoriser la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes (Dunn KJ. *et al.* 2005).

c. Organes cibles

Les mélanocytes sont des cellules pigmentaires dendritiques dont le principal organe cible est la peau. Cependant, il existe aussi des mélanocytes dans d'autres organes tels que : les yeux (iris), le cœur, l'oreille interne, la cochlée, le tissu adipeux et le cerveau (mésencéphale). (Figure 6)

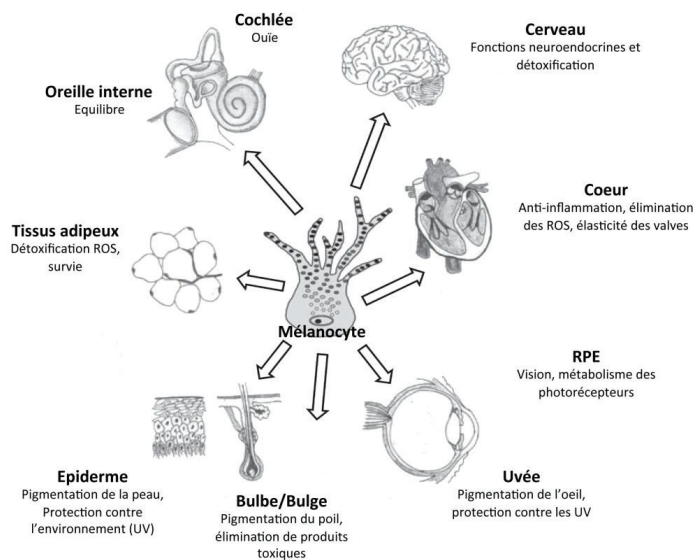


Figure 6 Les différentes localisations et fonctions des mélanocytes dans l'organisme (D'après Plonka *et al.*, 2009). Des mélanocytes peuvent se trouver dans le cœur, l'oreille interne, les tissus adipeux, l'œil, l'épiderme ou le follicule pileux et avoir des fonctions différentes en fonction de leur localisation.

Les mélanocytes ont des fonctions qui varient selon leurs localisations dans l'organisme (Plonka *et al.*, 2009). La première fonction des mélanocytes est la pigmentation de la peau, des yeux et des cheveux ainsi que la photoprotection (peau et yeux). De plus, ils peuvent jouer un rôle dans la réduction du stress oxydatif (peau, cœur) ou la réduction de l'inflammation (cerveau). Enfin, les mélanocytes ont aussi un rôle sensitif dans : la vision (yeux), l'ouïe (cochlée) et l'équilibre (oreille interne). Tous ces mélanocytes ont des fonctions essentielles dans chacun de leurs organes cibles. Une perturbation du fonctionnement ou du nombre de ces cellules peut engendrer des malformations (Yamaguchi et Hearing, 2014; Mort *et al.*, 2015).

d. Les mélanocytes épidermiques

Les mélanocytes épidermiques sont des cellules de grande taille dont les nombreux prolongements, appelés dendrites, peuvent atteindre la 3^{ème} couche de kératinocytes. Ils produisent les mélanines au sein d'organites spécialisés, appelés mélanosomes, qui migrent le long des dendrites et sont transférés aux kératinocytes adjacents. On définit une unité épidermique de mélanisation (UEM) comme un ensemble comprenant un mélanocyte et les kératinocytes qui reçoivent la mélanine de ce mélanocyte, soit 36 kératinocytes. (*La peau, Structure et Physiologie*, Méliissopoulos A. et Levacher C., TEC, 2^{ème} édition, 2012) (Figure 7)

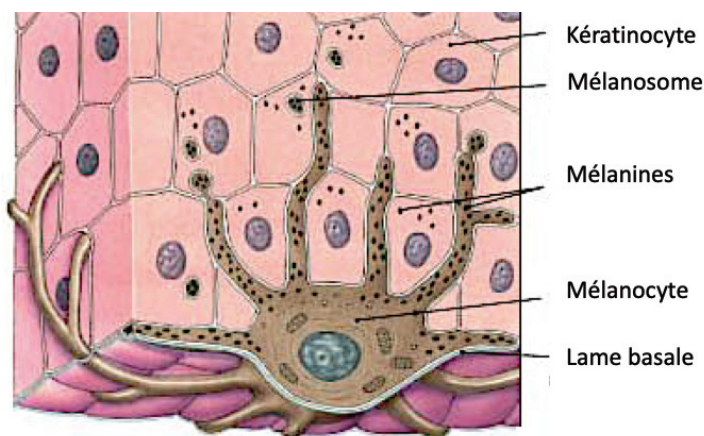








Figure 7 L'unité épidermique de mélanisation.

Les mélanines, produites par les mélanocytes et transférées aux kératinocytes, constituent 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 N. *et al.*, 1993; Kadarko AL. *et al.*, 2003). Les mélanines jouent leur rôle photo-protecteur à différents niveaux. Par leur qualité de chromophores, elles absorbent les photons, diminuant la quantité de rayons ultra-violet (UV) atteignant l'épiderme et fixant les espèces réactives de l'oxygène (Bustamante *et al.* 1993).

B. La pigmentation cutanée

1. La couleur de la peau

La pigmentation de la peau est classée selon son intensité, la couleur des yeux, des cheveux et la capacité de la peau à pigmenter lorsqu'elle est exposée aux rayons UV. Utilisée depuis les années 1970, la classification de Fitzpatrick (Figure 8) permet de distinguer 6 phototypes correspondants à des couleurs de peau différentes :

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

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

Figure 8 Les différents phototypes : classification de Fitzpatrick

La couleur de la peau humaine est déterminée par des gènes qui contrôlent la pigmentation naturelle dite « constitutive » et par des facteurs environnementaux, en particulier les rayonnements ultraviolets solaires qui induisent la pigmentation dite « facultative » (Ortonne JP., 2009).

À ce jour, on dénombre 378 *loci* impliqués dans la pigmentation (décrits chez la souris et leurs homologues chez l'Homme et le poisson zèbre) lorsqu'ils sont mutés (<http://www.espcr.org/micemut>). Cependant, le gène impliqué n'est encore identifié que dans la moitié des cas environ (171 gènes clonés et 207 gènes non clonés). Ces gènes contrôlent, directement ou indirectement, des mécanismes complexes à l'origine de la diversité de couleurs de la peau, des phanères et des yeux. La plupart d'entre eux affectent le développement, la différenciation et la survie des mélanocytes. D'autres affectent la biogenèse, la maturation, le transport ou le transfert des mélanosomes.

La couleur de notre peau résulte d'un mélange de plusieurs pigments : l'hémoglobine oxygénée (rouge), l'hémoglobine réduite (bleue), le carotène (jaune orange) ainsi que 2 types de mélanines : l'eumélanine (brun noir) et la phéomélanine (jaune orangé). Ces dernières, produites par les mélanocytes au sein des mélanosomes, sont responsables de l'essentiel de la pigmentation cutanée. Contrairement aux idées reçues, ce n'est pas le nombre de mélanocytes présents dans notre épiderme qui détermine notre couleur de peau. Que notre peau soit noire ou blanche, elle est composée du même nombre de mélanocytes (Szabo, 1967). C'est essentiellement la quantité et le type de mélanine produite par les mélanocytes qui sont à l'origine des différentes couleurs de peau.

2. La synthèse des mélanines ou mélanogénèse

Les mélanines sont produites au sein des mélanosomes au cours d'un processus complexe appelé : mélanogénèse. Ces pigments sont le produit final de multiples réactions enzymatiques conduisant à la synthèse de 2 types de biopolymères : l'eumélanine et la phéomélanine. L'eumélanine et la phéomélanine dérivent d'un précurseur commun : la DOPAquinone (DQ) qui est formée à partir de l'hydroxylation de L-tyrosine en un intermédiaire transitoire, la DOPA (ou 3,4-dihydroxyphénylalanine qui est un précurseur dans la synthèse des catécholamines) puis de l'oxydation de cette dernière. Ces deux réactions font intervenir l'enzyme tyrosinase (TYR). La DOPAquinone sera ensuite transformée différemment selon le type de mélanine produite. (Figure 9)

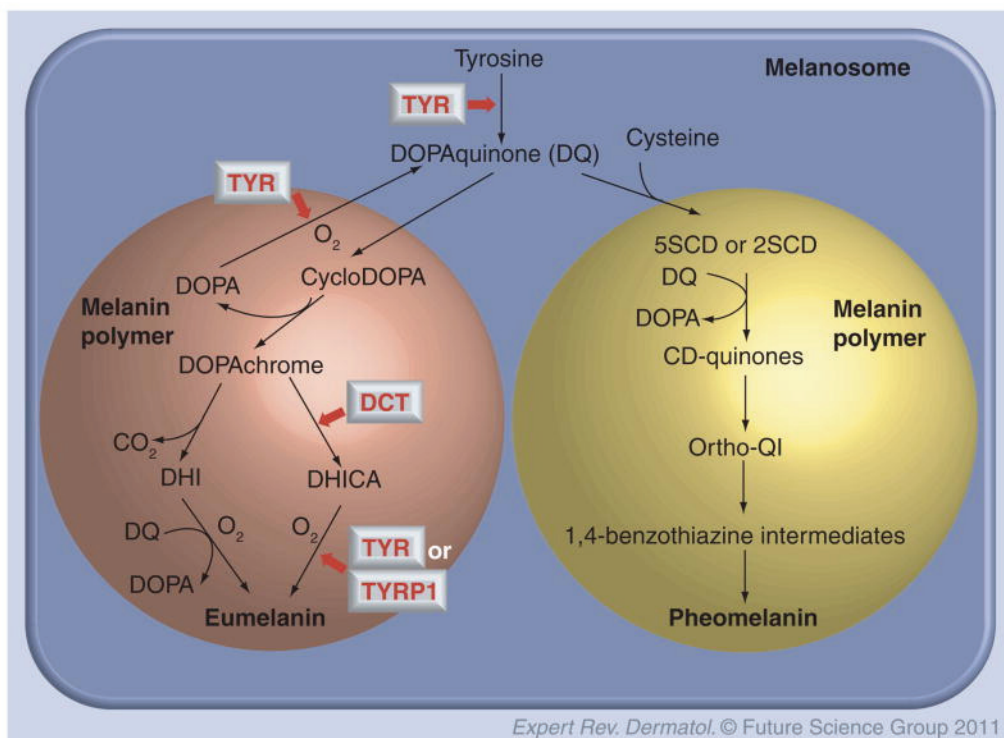


Figure 9 Les voies de biosynthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine.(D'après Kondo T. and Hearing VJ., 2011)

a. Eumélanogenèse

Suite à la production de la DOPAquinone, la première étape dans l'eumélanogenèse implique la cyclisation de la quinone pour produire la cycloDOPA qui va rapidement subir une réaction d'oxydo-réduction avec d'autres molécules de DOPAquinone pour produire une molécule de DOPA et une molécule de DOPAchrome (Land EJ. *et al.*, 2003). La DOPAchrome est spontanément décomposée par décarboxylation à pH neutre pour former le 5,6-dihydroxynindole (DHI) et le 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acide (DHICA) avec un ratio de 70 :1 (Palumbo A. *et al.*, 1987). En présence d'une enzyme spécifiquement produite par les mélanocytes, la DOPAchrome tautomerase (DCT), aussi connue sous le nom de TYRP2 (TYR-related protein-2), la DOPAchrome subit une tautomérisation pour produire exclusivement le DHICA (Palumbo A. *et al.*, 1991). L'activité de l'enzyme DCT détermine le ratio de DHI et DHICA (Tsukamoto K. *et al.*, 1992). Finalement, la DHI et la DHICA sont oxydées et polymérisées pour former l'eumélanine. L'oxydation de la DHICA requiert l'action de l'enzyme TYR (Olivares C. *et al.*, 2001) chez l'humain ou de l'enzyme TYRP1 (TYR-related protein-1) chez la souris (Jimenez-Cervantes C. *et al.*, 1994). De manière intéressante, TYRP1 ne peut pas catalyser l'oxydation de DHICA chez l'humain (Boissy RE. *et al.*, 1998). Inversement, TYR ne peut pas catalyser l'oxydation de DHI chez la souris. L'activité de ces 2 enzymes affectent la quantité et la qualité des eumélanines produites. (Figure 9)

b. Pheomélanogenèse

La première étape de la phéomélanogenèse est l'addition de cystéine à la DOPAquinone pour produire 2 types d'isomères de cysteinylDOPA (CD) : le 5SCD et le 2SCD. La deuxième étape est l'échange redox entre CD et DQ pour produire les CD-quinones et la DOPA. Les CD-quinones sont ensuite déshydratées pour former l'ortho-quinonimine (ortho-QI) qui est réarrangé, avec ou sans décarboxylation, pour donner des

intermédiaires de 1,4 benzothiazine qui sont finalement polymérisés en phéomélanine (Wakamatsu K. *et al.*, 2009). Contrairement à l'eumélanogénèse, où l'activité des enzymes TYR, TYRP1 et DCT est essentielle, la phéomélanogénèse ne fait intervenir que l'enzyme TYR et des résidus de cystéine comme précurseurs nécessaires à la production de phéomélanine. (Figure 9)

c. Les enzymes de la mélanogénèse

Les trois enzymes de la mélanogénèse, TYR, TYRP1 et DCT sont des protéines transmembranaires localisées à la membrane des mélanosomes. Elles possèdent environ 40 % d'homologie de séquence. Les régions conservées correspondent aux domaines fonctionnels importants comme la partie C-terminale (peptide signal), le domaine transmembranaire, deux sites de liaison au cuivre et trois régions riches en cystéines impliquées dans le repliement correct et le maintien du domaine N-terminal (Klabunde *et al.*, 1998). Elles sont synthétisées sous forme de protéines d'environ 55 kDa, qui vont mûrir et subir des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi, avant d'être délivrées aux mélanosomes sous forme de protéines matures glycosylées d'environ 75 kDa (Kwon BS., 1993).

Chez la souris, *Tyr*, *Tyrp1* et *Dct* sont codées respectivement par les *loci albino*, *brown* et *slaty*. Les noms attribués aux différents *loci* correspondent aux phénotypes observés lorsque le gène est muté. (Figure 10)

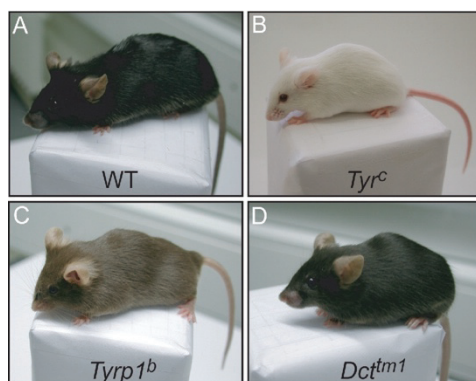


Figure 10 Phénotypes correspondants aux mutations des gènes *Tyr* (locus *albino*), *Tyrp1* (locus *brown*) et *Dct* (locus *slaty*) chez la souris. (D'après Murisier F. *et al.*, 2006)

d. Rapport eumélanine/phéomélanine

Le rapport eumélanine/phéomélanine est fondamental pour le déterminisme de la couleur de la peau et pour sa photoprotection (Rees JL., 2004). Il est déterminé par plusieurs variables comme l'activité des enzymes de la mélanogenèse ainsi que la disponibilité en tyrosine et/ou en composés soufrés. Ce ratio peut varier sous l'influence des UV qui favorisent l'eumélanogenèse. Ce processus, appelé communément le bronzage, constitue une réponse adaptative de l'organisme à des expositions prolongées au soleil. Les UVB induisent la formation de dimères dans les chaînes d'acide désoxyribonucléique (ADN), entraînant des défauts métaboliques (vieillessement), la mort cellulaire ou l'acquisition de propriétés de multiplication désordonnées (cancers). Les UVA, longtemps considérés comme inoffensifs, ont pourtant des effets délétères dus à la production de radicaux libres et de dimères de pyrimidines. Les eumélanines sont capables d'absorber les photons émis et de capter les radicaux libres générés dans les cellules par les radiations UV, empêchant l'ADN d'être endommagé. Elles protègent ainsi la peau des effets nocifs des radiations UV. Elles ont un pouvoir photoprotecteur environ 1 000 fois supérieur à celui des phéomélanines. Au contraire, les phéomélanines, à la fois sous l'effet des UVA mais également de façon indépendante des rayons UV, sont impliquées dans la genèse du mélanome via des mécanismes de dommages oxydatifs sur l'ADN (Noonan FP. *et al.*, 2012 ; Mitra D. *et al.*, 2012).

Le gène **MC1R** (MelanoCortin 1 Receptor), codant le récepteur à la mélanocortine (α -MSH) de type 1, contrôle le rapport eumélanine/phéomélanine. C'est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G α s qui est exprimé dans les mélanocytes. Son activation stimule l'eumélanogenèse. Chez l'Homme, il existe un polymorphisme important du gène **MC1R**. Les personnes rousses possèdent deux allèles inactifs du gène **MC1R**, entraînant la production de phéomélanines qui conduisent à un

phototype caractérisé par une peau blanche, une incapacité à bronzer et une propension à développer des taches de rousseur (Schiøth HB. *et al.*, 1999). Des études suggèrent que des variations génétiques de *MC1R* seraient responsables d'un photo-vieillessement précoce et sévère et d'un risque accru de carcinomes basocellulaires (Elfakir A. *et al.*, 2010 ; Ferruci LM., *et al.*, 2012).

Chez la souris, il existe un antagoniste du *MC1R* dénommé ASP (*Agouti*) qui inhibe la production d'eumélanines et stimule la phéomélanogénèse. (Figure 11)

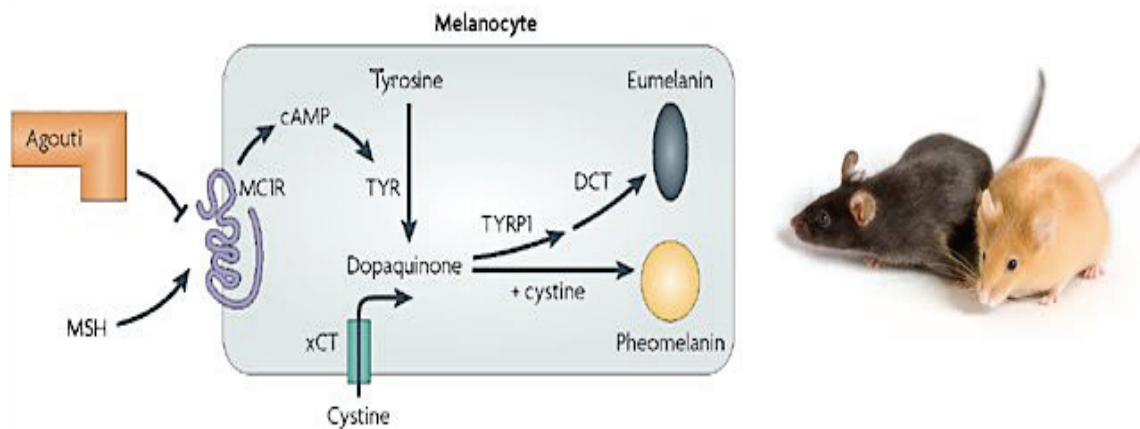


Figure 11 Rôle du récepteur *MC1R* et de la protéine *Agouti* dans le déterminisme de la synthèse d'eumélanine et de phéomélanine. Chez la souris le gène *Agouti* détermine sa couleur de pelage jaune orangé.

Les mutations murines au *locus extension* (qui code *MC1R*), entraînant la perte de fonction du récepteur, sont caractérisées par des souris au pelage jaune orangé contenant essentiellement de la phéomélanine (Vage DI. *et al.*, 1997). Inversement, une mutation gain de fonction de *MC1R*, donne un phénotype noir chez la souris.

Par ailleurs, l'étude de patients atteints de Cystinose a montré l'implication du gène *CTNS* (codant pour la cystinosine), localisé sur le chromosome 17(17p13) chez l'Homme, dans la synthèse de la mélanine. En effet, l'inactivation du gène *CTNS* induit une réduction de la synthèse de mélanine par dégradation de la tyrosinase par les protéases

lysosomales. Chez les patients souffrant de cystinose, on observe une diminution de 50% de la concentration en eumélanine et une concentration en phéomélanine doublée, ce qui souligne le rôle du gène *CTNS* dans la mélanogenèse en général, et plus particulièrement, dans le ratio eumélanine/phéomélanine (Chiaverini C. *et al.*, 2012).

3. Biogenèse et maturation des mélanosomes

Les mélanosomes produits par les mélanocytes sont le lieu de synthèse et de stockage de la mélanine. La mélanogenèse se déroule en deux étapes majeures qui permettent tout d'abord de former un organite immature dit non pigmenté qui poursuit progressivement sa maturation en mélanosome pigmenté avant d'être finalement transféré aux kératinocytes adjacents.

a. Description des différents stades de maturation

Plusieurs stades de maturation peuvent être observés lors de l'étude des mélanosomes en microscopie électronique :

- Stade I : les pré-mélanosomes sont comparables à des vésicules de forme sphérique et non pigmentées. Ce stade correspond à la synthèse de l'organite. A l'intérieur, on trouve des molécules de tyrosinase non active formant des filaments hélicoïdaux.
- Stade II : les pré-mélanosomes deviennent ovoïdes. Ils apparaissent plus fortement striés car les filaments protéiques s'organisent et s'entrecroisent.
- Stade III : la structure interne du mélanosome est semblable à celle du stade II mais des dépôts matriciels opaques de mélanine denses aux électrons sont retrouvés. Ce stade correspond au début de la synthèse de mélanine.
- Stade IV : le mélanosome est considéré comme « mature ». Il contient une matrice uniformément opaque, très dense aux électrons car entièrement mélanisée.

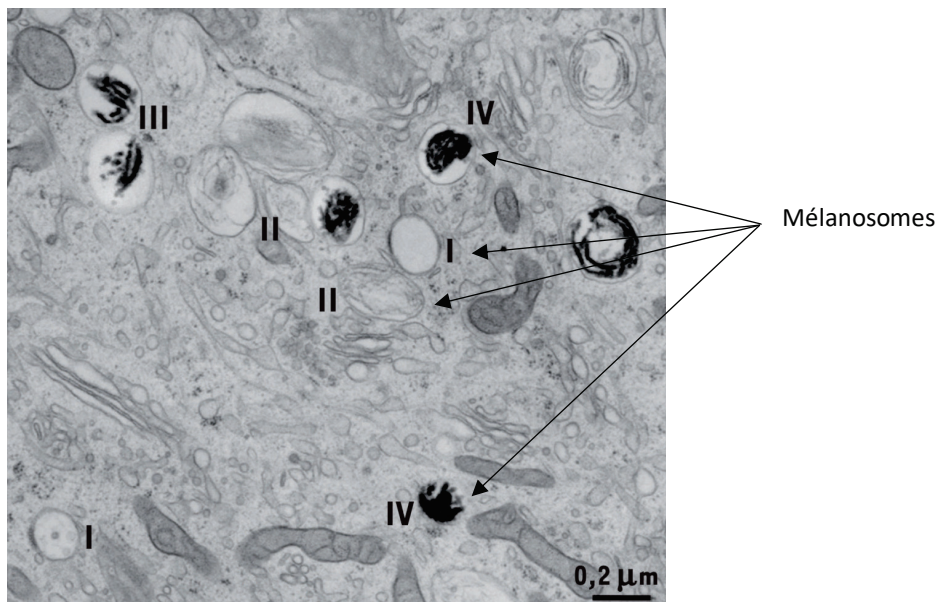


Figure 12 Différents stades de maturation du mélanosome observés en microscopie électronique.

(Adapté d'après Delevoeye C. et al., 2011)

b. Origine des mélanosomes

Les mélanosomes appartiennent à une classe d'organites cytoplasmiques apparentés aux lysosomes (LRO : lysosomal related organelles). Il est intéressant de souligner que ces organites sont présents dans différents types cellulaires comme : les lymphocytes, les macrophages, les plaquettes et les cellules endothéliales. Ils partagent des caractéristiques communes aux lysosomes. En effet, ils possèdent des protéines lysosomales (protéines de la membrane du lysosome et hydrolases) et sont accessibles à la voie d'endocytose. Tout comme les lysosomes, leur pH est acide. Cependant, les 2 organites ont des structures et des fonctions clairement distinctes.

Il a été proposé que les mélanosomes soient issus du réticulum endoplasmique (Kushimoto T. *et al.*, 2001 ; Yasumoto K. *et al.*, 2004). Plusieurs travaux apportent pourtant des arguments en faveur de leur origine endosomale (Berson JF. *et al.*, 2001).

Au carrefour des voies d'endocytose, de biosynthèse et de dégradation, les endosomes sont la principale plateforme de tri moléculaire. Ils se composent de domaines vacuolaires et tubulo-vésiculaires comprenant les endosomes précoces de tri et de

recyclage. Au cours de leur maturation, ces domaines vacuolaires accumulent progressivement des vésicules dans leur lumière et forment ainsi des corps multivésiculaires (CMV). Ils se localisent ensuite dans la voie d'endocytose et fusionnent avec les lysosomes afin d'y dégrader leur contenu. Dans certains types cellulaires, ces CMV peuvent également fusionner avec la membrane plasmique pour sécréter leur vésicules intraluminales (exosomes) dans le milieu extracellulaire (Simons M. *et al.*, 2009).

c. Biogenèse et maturation des mélanosomes

La biogenèse des mélanosomes dépend de protéines mélanosomales qui transitent par les voies de biosynthèse et d'endocytose et exploitent les mécanismes moléculaires du trafic intracellulaire. Le stade de maturation des mélanosomes le plus précoce (stade I) correspond à des endosomes communs à la voie d'endocytose et à la biogenèse des mélanosomes (Raposo G. *et al.*, 2001). Les 2 voies se séparent lors de la formation des mélanosomes de stade II qui, eux, adoptent une forme ellipsoïdale due à la présence de fibres protéiques de nature amyloïdes qui servent de support à la séquestration de la mélanine. Le constituant principale de ces fibres est la protéine transmembranaire Pmel17 (Berson JF. *et al.*, 2001).

Pmel17 (Premelanosome protein 17), aussi connue sous le nom de gp100, est une glycoprotéine de 110 kDa spécifique des mélanocytes, localisée dans la matrice des mélanosomes et codée par le *locus silver* de la souris (chromosome 12 chez l'homme). PMEL17 joue un rôle essentiel dans les premières étapes du développement des mélanosomes en formant, après clivage protéolytique, une matrice amyloïde fibrillaire permettant le dépôt de la mélanine. Le domaine NTR de PMEL17 contrôle l'assemblage hiérarchique des fibrilles mélanosomales. (Leonhardt *et al.*, 2013).

Les enzymes impliquées dans la synthèse de mélanine, tyrosinase et TYRP1, sont transportées vers les prémélanosomes entraînant leur maturation vers les stades III et IV. Pour véhiculer les protéines mélanosomales vers le mélanosome, la cellule doit mettre en place des systèmes de reconnaissance qui permettent leur identification et leur tri parmi toutes les protéines de la cellule. Dans les mélanocytes, **AP-3** (adaptor protein-3) interagit avec la tyrosinase et participe à son transport depuis les endosomes précoces vers les mélanosomes. Un autre adaptateur moléculaire apparenté à AP-3, nommé **AP-1**, peut interagir avec la tyrosinase et la prendre en charge lorsque AP-3 n'est plus fonctionnel. AP-1 participe aussi au transport d'une autre enzyme de la mélanogénèse TYRP1 (Theos AC. *et al.*, 2005). Les protéines *cargos* triées par AP-1 ou AP-3 sont ensuite adressées aux mélanosomes grâce aux complexes **BLOC-1** et **BLOC2**. (Figure 13)

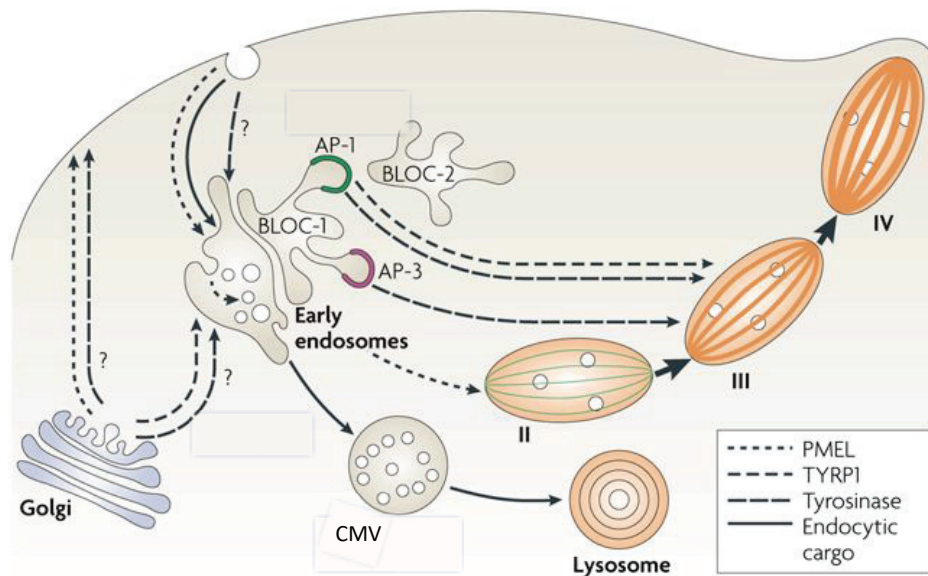


Figure 13 La voie d'endocytose et la biogenèse des mélanosomes. (D'après Raposo G. *et al.*, 2007) Les mélanosomes proviennent de la voie d'endocytose et restent distincts des lysosomes. La protéine Pmel17 transite par les endosomes précoces afin de générer les fibres intraluminales caractéristiques des prémélanosomes de stade II. Les enzymes tyrosinase et TYRP1, sont adressées depuis les intermédiaires endosomiaux aux mélanosomes en cours de maturation (stades II et III) grâce aux adaptateurs AP-1 et AP-3 ainsi qu'aux complexes BLOC. Les mélanosomes matures sont transportés grâce au réseau de microtubules vers l'extrémité des dendrites avant d'être transférés aux kératinocytes.

Dans les mélanocytes, les mélanosomes les plus pigmentés correspondant aux stades III et IV, se répartissent à l'extrémité des dendrites. Les enzymes de la mélanogenèse sont donc transportées du centre de la cellule, où elles sont synthétisées, vers les mélanosomes grâce à des moteurs moléculaires comme les myosines ou kinésines, en s'associant au cytosquelette d'actine ou au réseau de microtubules.

Il a été montré que **KIF13A**, une kinésine qui interagit avec AP-1, coordonne à la fois le tri des enzymes dans les endosomes ainsi que leur transport à proximité des mélanosomes (Delevoye C. *et al.*, 2009). Une étude récente a montré que les protéines DCT et MART1 (aussi appelée MelanA) sont transportées directement à partir du réseau Golgien via la voie de sécrétion (Patwardhan A. *et al.*, 2017).

4. Transport et transfert des mélanosomes

a. Transport des mélanomes

Les mélanosomes sont transportés jusqu'à l'extrémité des dendrites des mélanocytes sur le réseau de microtubules grâce à la kinésine (transport antérograde) ou la dynéine (transport rétrograde). Une fois parvenus à l'extrémité, les mélanosomes se détachent du microtubule et se lient aux microfilaments d'actine grâce à la myosine Va (Wu XS. *et al.*, 1998). La myosine Va est recrutée aux mélanosomes par l'intermédiaire de Rab27a et de la mélanophiline, une protéine de liaison aux protéines Rab (Wu XS. *et al.*, 2002). Cette étape permet la rétention des mélanosomes sous la membrane plasmique en attendant d'être transférés aux kératinocytes adjacents. (*Figure 14*)

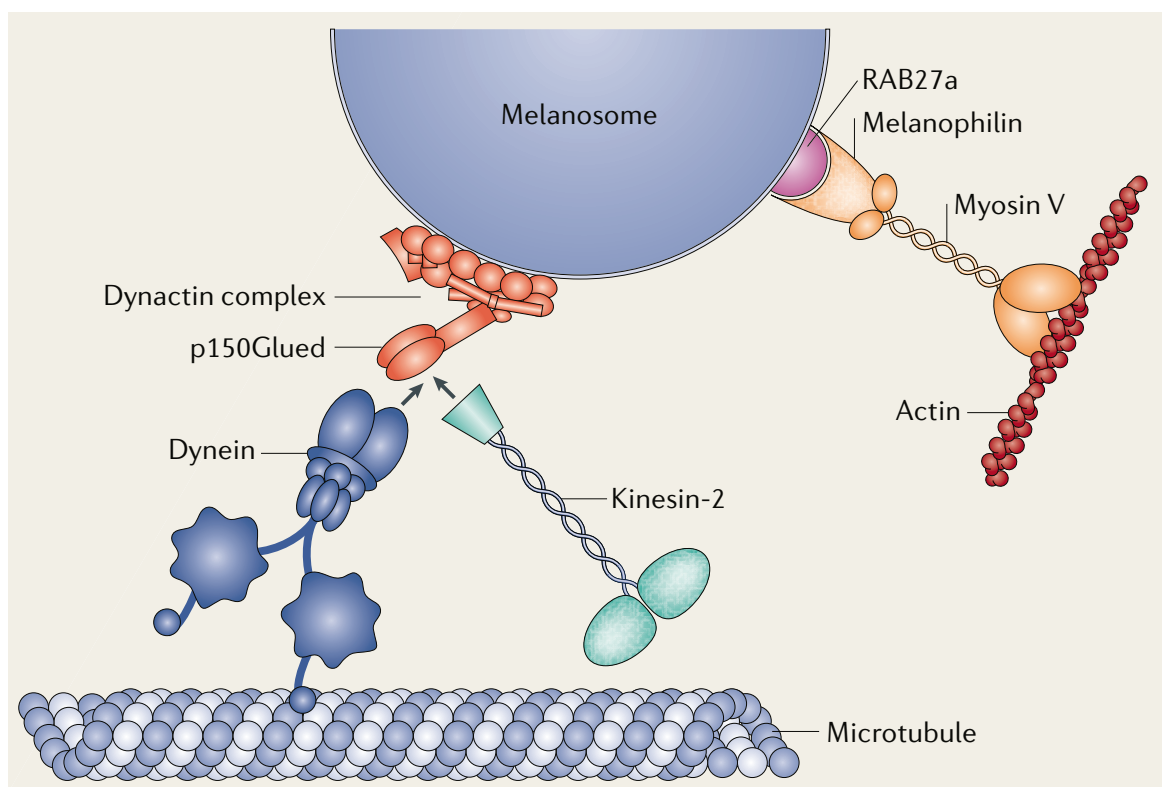


Figure 14 Transport des mélanosomes. (D'après Soldati and Schliwa, 2006)

b. La synapse pigmentaire

Les mélanocytes sont en contact étroit avec les kératinocytes. Le site d'interaction entre les 2 types cellulaires fait intervenir de nombreuses molécules d'adhésion, notamment E-cadhérine et P-cadhérine. Par analogie avec les synapses neuronale ou immunologique, un modèle hypothétique de synapse pigmentaire a été proposé (Van Den Bossche *et al.*, 2006). Cette synapse fait intervenir les récepteurs PAR-2 (protease-activated receptors) et KGFR (keratinocyte growth factor receptor) qui sont tous deux exprimés à la surface des kératinocytes. Il a été montré que la stimulation de PAR-2 et de KGFR augmente la phagocytose des mélanosomes par les kératinocytes et conduit à une augmentation du transfert de mélanosomes (Sharlow ER. *et al.*, 2000 ; Cardinali G. *et al.*, 2005). La phagocytose via KGFR est dépendante de la voie PAR-2-Rho et de l'activation de Rac et Cdc42 (Cardinali G. *et al.*, 2005).

Par analogie à la synapse phagocytaire, la synapse pigmentaire engage des lectines, récepteurs qui se lient à des sucres présents à la surface des cellules et participent à la reconnaissance mélanocyte-kératinocyte (Cerdan *et al.*, 1992). (Figure 15)

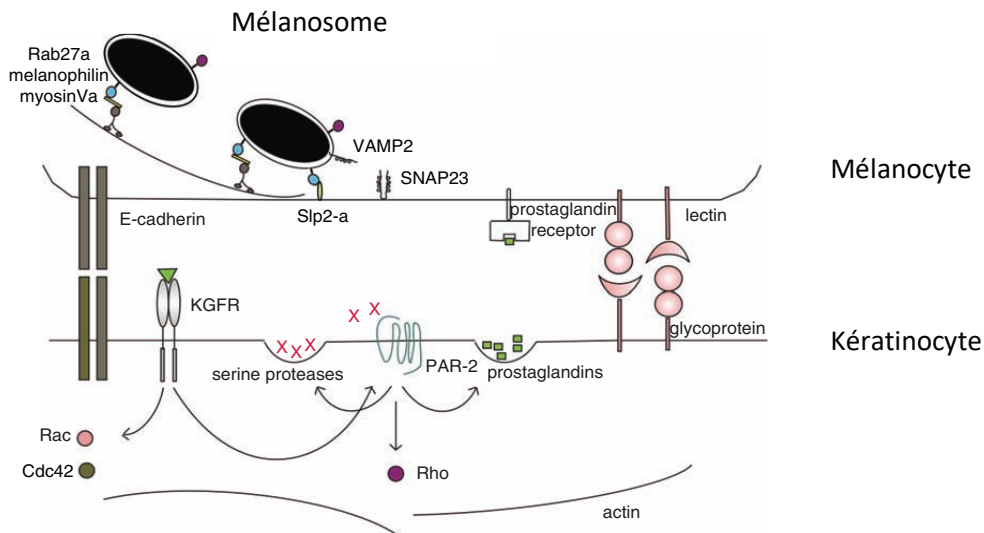


Figure 15 Modèle hypothétique de la synapse pigmentaire. (D'après Van Den Bossche *et al.*, 2006)

c. Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes

Les mécanismes impliqués dans le transfert des mélanosomes, depuis les mélanocytes aux kératinocytes, restent encore aujourd'hui mal compris et plusieurs hypothèses ont été formulées. (Figure 16) Quatre processus distincts, mais non mutuellement exclusifs, peuvent expliquer le transfert des mélanosomes (Wu *et* Hammer, 2014) :

- La cytophagocytose : le kératinocyte phagocyterait l'extrémité de la dendrite du mélanocyte contenant plusieurs mélanosomes.
- La fusion des membranes : il y aurait formation d'un nanotube entre le kératinocyte et le mélanocyte, permettant la diffusion des mélanosomes entre les 2 types de cellules.

- La phagocytose par les kératinocytes de vésicules membranaires contenant des mélanosomes.
- L'exocytose de pigments nus de toute membrane (appelés mélanocores issus de mélanosomes) dans le milieu extra-cellulaire, suivi d'une internalisation par les kératinocytes.

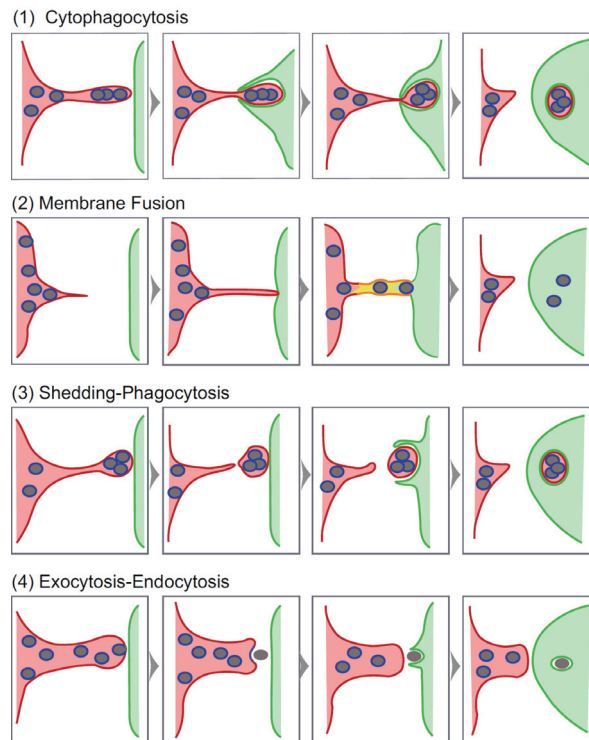


Figure 16 Les différents mécanismes possibles de transfert des mélanosomes aux kératinocytes. (D'après Wu et Hammer, 2014)

Par ailleurs, les kératinocytes, prêts à ingérer les mélanosomes, vont sécréter un facteur soluble, le FGF2 (basic fibroblast growth factor). Ce facteur, dont l'expression est sous la dépendance du facteur de transcription FOXN1, constitue un signal adressé aux mélanocytes afin de les éduquer au transfert des mélanosomes (Weiner L. *et al.*, 2007).

Une fois transférées, les vacuoles contenant les mélanosomes subissent une dégradation, avec relargage cytoplasmique des mélanosomes, qui sont ensuite progressivement éliminés avec les kératinocytes lors de leur ascension vers les couches superficielles de l'épiderme.

C. Régulation de la pigmentation et voies de signalisation intracellulaire

La couleur de la peau est soumise à des variations sous l'influence de *stimuli*, externes et internes, qui agissent directement sur le mélanocyte mais, également, de manière indirecte, sur les kératinocytes environnants. Ces *stimuli* vont induire des modifications dans la quantité et la qualité des mélanines synthétisées, la dendricité mélanocytaire et le transfert des mélanosomes aux kératinocytes environnants.

Trois principaux facteurs physiologiques interviennent dans la régulation de la pigmentation :

- Le rayonnement solaire ;
- Les facteurs de croissance ;
- Le micro-environnement cellulaire des mélanocytes (kératinocytes, fibroblastes)

In vivo, la mélanogénèse est régulée principalement par le rayonnement UVA et UVB du spectre solaire. Les rayonnements UVA et UVB pénètrent jusqu'à la couche basale de l'épiderme ; ils peuvent donc agir sur les mélanocytes et les kératinocytes. Des études montrent que les UV, et plus particulièrement les UVB, peuvent agir directement sur les mélanocytes pour stimuler la mélanogénèse. Par ailleurs, l'exposition des kératinocytes aux UVB entraîne la production de nombreux agents qui régulent la croissance, la différenciation et la mélanogénèse des mélanocytes épidermiques. L'action coordonnée de ces différents facteurs, ainsi que l'effet direct des UV sur les mélanocytes, aboutit à une augmentation de la pigmentation cutanée, plus communément appelé : bronzage.

1. Effets directs des ultraviolets

Les UVA et UVB induisent de nombreuses lésions dans l'ADN, parmi lesquelles la formation de dimères de pyrimidine est la plus fréquente. Des travaux ont montré que des agents chimiques qui induisent des lésions de l'ADN sont capables de stimuler la mélanogenèse (Eller MS. *et al.*, 1996). De plus, l'addition de dimères de thymine, qui sont généralement excisés par des enzymes de réparation, entraîne une augmentation de la synthèse de mélanines. Ces résultats suggèrent que l'excision des dimères de la thymine est un événement essentiel dans la régulation de la mélanogenèse photo-induite.

Par ailleurs, sous l'action directe des UV, l'activation de la protéine de stress p38 va activer le facteur de transcription USF1 (Upstream stimulatory factor 1) qui, à son tour, va induire la transcription de l'enzyme TYR (Galibert MD. *et al.*, 2001).

2. Effets indirects des ultraviolets

De nombreux facteurs sécrétés par les kératinocytes, sous l'effet des rayons UV, stimulent la mélanogenèse. En effet, il a été montré que des milieux conditionnés par des kératinocytes préalablement irradiés par des rayons UV stimulent la prolifération et la synthèse de mélanine de mélanocytes en culture (Park HY. *et al.*, 2009).

Les principaux sont l' α MSH (alpha melanocyte stimulating hormone) et l'ACTH (adrenocorticotrop hormone), ET-1 (endothéline-1), le SCF (stem cell factor) et le NO (monoxyde d'azote). (*Figure 17*)

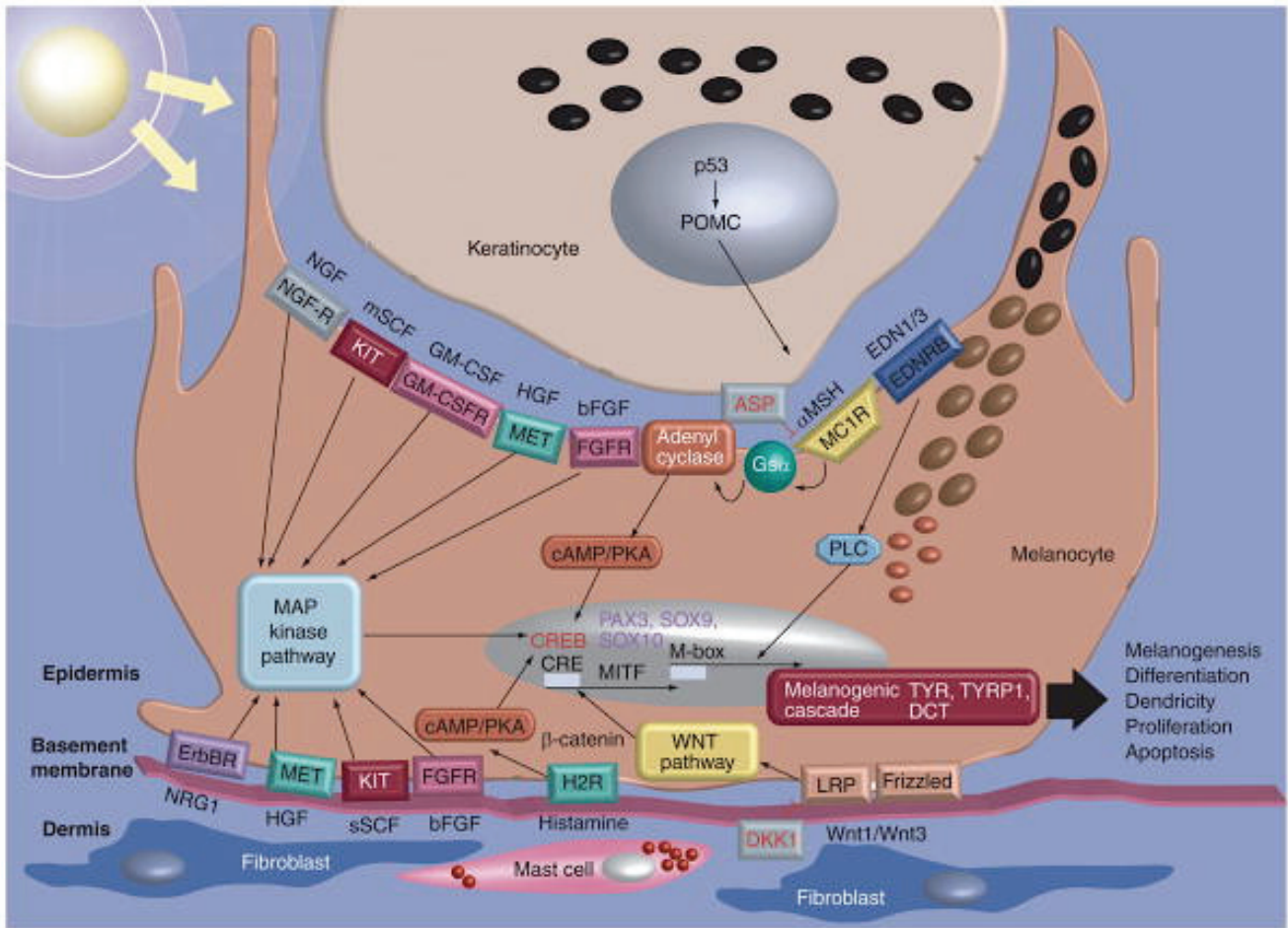


Figure 17 Principales facteurs et voies de signalisation régulant la fonction mélanocytaire dans la peau. (D'après Kondo T. et Hearing VJ., 2011). Les antagonistes des récepteurs MC1R et LRP sont en rouge (ASP et DKK1).

a. Peptides pro-opiomélanocortiques

L'**αMSH** et l'**ACTH** dérivent d'un précurseur commun de plus haut poids moléculaire : la pro-opiomélanocortine (POMC) (Tastmali M. *et al.*, 2000). Ces hormones mélanotropes sont des ligands physiologiques du récepteur MC1R.

Dans les conditions physiologiques, la mélanogenèse est principalement stimulée par les radiations UV du spectre solaire. Les UV qui pénètrent jusqu'à la couche basale de l'épiderme stimulent la production d'**αMSH** qui à son tour augmente les niveaux d'ARNm MC1R dans les mélanocytes. Les dommages à l'ADN, induits par les UV, entraînent également l'augmentation de p53 qui va se fixer sur le promoteur de *POMC* et induire sa

transcription (Cui R. *et al.*, 2007). L'activation de MC1R par ses ligands va conduire dans le mélanocyte à la stimulation en cascade de l'adénylate cyclase (AC), de la concentration en adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc) et de la protéine kinase A (PKA). La PKA activée va à son tour stimuler l'expression du facteur de transcription MITF qui contrôle l'expression des enzymes de la mélanogénèse, induit la synthèse des mélanines.

Les hyperpigmentations cutanées observées dans les maladies d'Addison et de Cushing sont liées à une augmentation du taux plasmatique d'ACTH. De plus, les individus atteints du Syndrome de McCune Albright, présentent des tâches café-au-lait due une mutation activatrice de la protéine G α s. Enfin, des lentigines sont retrouvées chez des individus atteints du Syndrome de Carney chez lesquels une mutation activatrice de la PKA a été mise en évidence.

b. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz diffusible dont la production est assurée par les NO-synthases à partir de l'arginine. Dans l'épiderme, les UV activent une NO-synthase de type neuronal et augmentent la production de NO qui semble être impliqué dans l'apparition des érythèmes cutanés et également dans la transmission du signal mélanogénique des UV (Virág L. *et al.*, 2002). Le NO, qui est produit par les kératinocytes et les mélanocytes, stimule la mélanogénèse des mélanocytes en culture. D'autre part, la stimulation de la mélanogénèse induite par les UV sur des monocultures mélanocytaires ou sur des cocultures mélanocytes-kératinocytes, est bloquée par des inhibiteurs de NO-synthase. Les effets du NO sont dus à l'activation d'une guanylate cyclase soluble mélanocytaire, entraînant une augmentation de la production d'acide guanosine monophosphorique cyclique (GMPC) par les mélanocytes. En effet, la mélanogénèse est stimulée par un analogue du GMPC. Les effets des UV et du NO sont bloqués par un

inhibiteur de la guanylate cyclase. Ces données montrent que le NO, sécrété à la fois par les mélanocytes et les kératinocytes, est impliqué dans une régulation autocrine et paracrine de la mélanogenèse, via une augmentation du contenu intramélanocytaire en GMPc. Comme pour l'AMPc, la cible moléculaire finale du NO et du GMPc est la tyrosinase dont ils augmentent l'expression et l'activité. En revanche, ils n'ont pas d'effet sur la croissance mélanocytaire.

c. Facteurs de croissance

Certains facteurs de croissance, tels que le basic fibroblast growth factor (bFGF), le stem cell growth factor (SCF), l'hepatocyte growth factor (HGF) et l'endothéline-1 (ET1), présents dans la circulation ou sécrétés par les kératinocytes, stimulent fortement la croissance mélanocytaire et induisent des effets divers sur l'activité mélanogénique des mélanocytes.

Le **SCF** est un facteur de croissance kératinocytaire qui se lie au récepteur transmembranaire (c-kit) possédant une activité tyrosinase kinase. La liaison à c-kit conduit à une auto-déphosphorylation du récepteur et à l'activation de la voie de MAPK (mitogen activated protein kinase). Les MAPK phosphorylent MITF conduisant à une augmentation de la transcription des enzymes de la mélanogenèse. L'injection de SCF humain recombinant induit une hypermélanocytose et une augmentation de l'activité mélanocytaire. De même, la surexpression de SCF, par les kératinocytes de souris transgéniques conduit à une hyperpigmentation épidermique.

L'**HGF** qui se lie au proto-oncogène à activité tyrosine kinase **c-met** est un puissant mitogène des mélanocytes. L'injection d'HGF dans des greffes de peau humaine transplantée sur des souris montre que l'HGF stimule la prolifération des mélanocytes.

L'HGF ne semble pas avoir d'effet sur l'activité mélanogénique des mélanocytes. Son effet pigmentogène est dû à une hypermélanocytose.

L'**ET1** est un peptide de 21 acides aminés décrit initialement comme un puissant vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales. Il est maintenant clairement établi que l'ET1 induit de nombreux autres effets, notamment en dehors du système vasculaire. En effet, des études récentes montrent que les kératinocytes produisent de l'ET1 qui peut agir sur les mélanocytes voisins, via les récepteurs EDNRA et EDNRB présents à leur surface. Des études réalisées uniquement *in vitro*, sur des cultures de mélanocytes humains, ont montré que l'ET1 stimule la croissance des mélanocytes et l'expression de la tyrosinase, suggérant que l'ET1 pourrait être, *in vivo*, un stimulateur de la pigmentation. Le **bFGF**, connu pour être impliqué dans la croissance des fibroblastes, présente également une activité mitogène pour les mélanocytes (Halaban R. *et al.*, 1988). Le bFGF est produit par les kératinocytes. Il se lie au récepteur FGFR présent à la surface des mélanocytes et active la voie des MAPK.

d. L'action des fibroblastes

Il a été montré, plus récemment, que les fibroblastes sécrètent également des facteurs qui vont réguler la pigmentation : **DKK1** (Dickkopf 1) et **NRG1** (Neuregulin-1). Ainsi, une étude comparative des fibroblastes des zones palmo-plantaires et des fibroblastes du reste du corps a montré que les fibroblastes palmo-plantaires exprimaient de forts taux de DKK1 qui est un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt (Yamaguchi Y. *et al.*, 2004). Les fibroblastes du reste du corps expriment majoritairement DKK3. La production exclusive de DKK1 par les fibroblastes palmo-plantaires induit une diminution de la pigmentation et une augmentation de l'épaisseur épidermique (Yamaguchi Y. *et al.*, 2008). Les auteurs ont ensuite montré que DKK1 diminuait la

croissance et la différenciation mélanocytaire, probablement en agissant sur MITF. Ces résultats montrent l'implication des fibroblastes dans la mélanogénèse et suggèrent une possible explication d'une plus faible pigmentation généralement observée sur les paumes et les plantes.

Depuis, il a été montré que les fibroblastes sont capables de produire des facteurs, agissant sur la mélanogénèse, qui diffèrent selon le phototype des personnes (Choi W. *et al.*, 2010). Ainsi, un de ces facteurs, NRG1 est secrété par les fibroblastes de peau noire (phototype VI). NRG1 augmente significativement la pigmentation des mélanocytes humains en culture. NRG1 apparaît comme un facteur important de la régulation de la pigmentation constitutive humaine et pourrait être impliqué dans la pathogénie des dermatoses pigmentaires.

e. Le rôle du système immunitaire

L'histamine, sécrétée par les mastocytes au cours de l'inflammation, peut se lier aux récepteurs H1 et H2 présents à la surface des mélanocytes et activer la voie de l'AMPC, stimulant la dendritogénèse et la transcription de tyrosinase (Yoshida M. *et al.*, 2000).

Une étude, parue en 2012, s'est intéressée au rôle de différentes cytokines (IL-4, IL-17A et IFN γ) produites par les LT4+ helper (LTh) sur des mélanocytes. Les auteurs montraient que l'IL-4 inhibe la mélanogénèse en diminuant la transcription et la traduction des gènes qui lui sont associés, en particulier le gène *MITF* et *DCT*, ainsi qu'en activant la voie JAK2/STAT2. Quant à l'IL-17A et l'IFN γ , ils inhibent indirectement la mélanogénèse par augmentation de la production de la cytokine anti-mélanogénèse-IL-6 dans les mélanocytes (Choi H. *et al.* 2012).

En 2013, une étude a montré qu'un SNP (single nucleotide polymorphism) dans un intron du gène codant pour IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4), facteur de transcription n'ayant aucun rôle connu dans la biologie des mélanocytes, était fortement

associé à la sensibilité de la peau à l'exposition au soleil, aux taches de rousseur, aux yeux bleus et aux cheveux bruns. Ce SNP se situe dans un amplificateur de la transcription de IRF4 dans les mélanocytes. L'allèle associé à ce phénotype de pigmentation altère la liaison du facteur de transcription TFAP2A qui, associé au régulateur principal des mélanocytes MITF, régule l'activité de l'amplificateur. Les analyses, effectuées sur le poisson-zèbre et les souris, révèlent que IRF4 coopère avec MITF pour activer l'expression de la tyrosinase et stimuler la synthèse de la mélanine (Praetorius C. *et al.*, 2013).

Plus récemment, il a été montré que le traitement de mélanocytes en culture par l'IFN γ entraîne une hypopigmentation résultant d'une diminution de l'expression des enzymes de la mélanogenèse TYR, TYRP1 et DCT. L'IFN γ impacterait, directement, la maturation des mélanosomes via l'activation du facteur de transcription IRF1 par l'intermédiaire de la voie JAK1/STAT1. (Natarajan VT. *et al.*, 2014).

3. Voies de signalisation intracellulaires et rôle de MITF

a. Voies de signalisations

Comme nous venons de le voir, de nombreux facteurs, intrinsèques ou extrinsèques, activent des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la fonction pigmentaire du mélanocyte. Les principales sont les suivantes :

- la voie de signalisation α -MSH/c-AMP ;
- la voie de signalisation des MAPK ;
- la voie de signalisation PI3K/Akt ;
- la voie de signalisation Wnt/ β -caténine ;
- la voie de signalisation du monoxyde d'azote.

Elles convergent toutes vers le « gène maître » de la pigmentation *MITF* qui code pour un facteur de transcription capable d'activer l'expression de nombreux gènes impliqués dans le développement, la dendricité, la prolifération et la survie du mélanocyte, dans la biogenèse et la maturation des melanosomes ainsi que la mélanogénèse. (Figure 18)

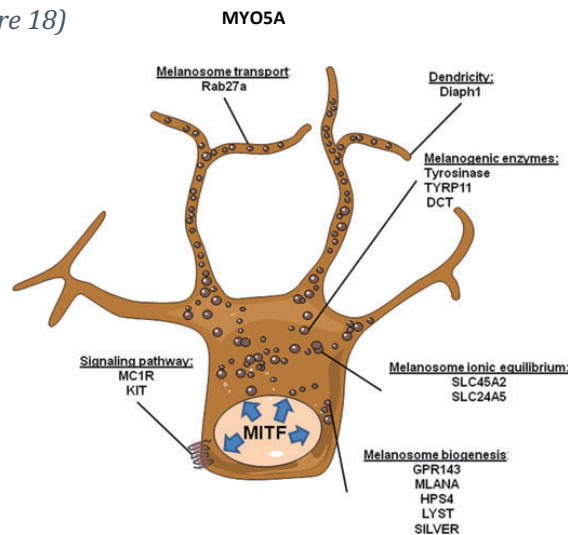


Figure 18 Rôle central de MITF qui contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la fonction pigmentaire du mélanocyte. (D'après Cheli Y. et al., 2009)

a. MITF

Le rôle du facteur de transcription MITF dans la pigmentation cutanée a été révélé grâce à différentes approches de perte de fonction. Chez la souris, l'inactivation du gène *Mitf*, au cours du développement embryonnaire, conduit à la naissance d'une souris présentant un phénotype caractéristique de l'absence de mélanocytes, à savoir : une dépigmentation (souris blanche), une microphthalmie et une surdité.

Chez l'homme, des mutations hétérozygotes de *MITF* sont responsables du syndrome de Wardenburg de type IIA caractérisé par une hypopigmentation hétérogène de la peau et des cheveux, et une surdité (Read et Newton, 1997).

MITF est un facteur de transcription à motif hélice-boucle-hélice qui fait partie de la famille MiT/TFE. Onze isoformes ont été décrits dans la littérature chez l'Homme. MITF-M est l'isoforme principalement exprimée dans les mélanocytes dérivés de la crête neurale et les mélanocytes du cerveau de l'épithélium rétinien pigmenté. Il lie les éléments promoteurs et régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans :

- la pigmentation (TYR, TYRP1, DCT)
- la prolifération et la survie des mélanocytes (comme BCL2, CDK2, BIRC7, FANCD2) (Bourseguin *et al.*, 2016 ; Du *et al.*, 2004)
- la maintenance et la réparation du génome (TERT, BRCA1, XPA, FANCA, ATM) (Beuret *et al.*, 2011 ; Strub T. *et al.*, 2011 ; Xia M. *et al.*, 2017)
- la réponse immunitaire (C-JUN) (Riesenberg *et al.*, 2015).

b. Régulation de MITF

Régulation transcriptionnelle

De nombreuses voies de transduction du signal, cytokines et facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de *MITF*. Le promoteur de *MITF* est la cible de plusieurs facteurs de transcription dont notamment PAX3, SOX10, CREB (C-AMP Response Element-binding protein), LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor-1), SOX9 et ONECUT-2 (one cut domain-2).

PAX3 et SOX10

PAX3 est un facteur de transcription à domaine « paired-box ». SOX10 est un facteur de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN homologue au domaine HMG (High mobility group) du gène SRY (Sex-determining Region of Y chromosome). Tous deux jouent un rôle clé dans la différenciation des cellules de la crête neurale au cours du développement embryonnaire. Une étude *in vitro* a montré que PAX3 agit conjointement

avec SOX10 pour induire l'expression de *MITF*. Ils ont montré que le promoteur *MITF* contient plusieurs régions d'activation SOX10. La séquence promotrice *MITF* contient un site de liaison à PAX3 qui est situé entre les positions -40 et -26. Cette région est connue pour être critique pour l'activation de la transcription de *MITF* (Bondurand N. *et al.*, 2000).

Une autre étude a montré que PAX3 coopère avec SOX10 pour activer l'expression de *MITF*, tout en empêchant simultanément MITF d'activer la transcription des gènes en aval (*TYR*, *TRP1*, *DCT*) par compétition pour l'occupation de l'élément promoteur (Lang D. *et al.*, 2005). Ce double rôle régulateur de PAX3 a une grande importance pour la régulation de *MITF*. (Figure 19)

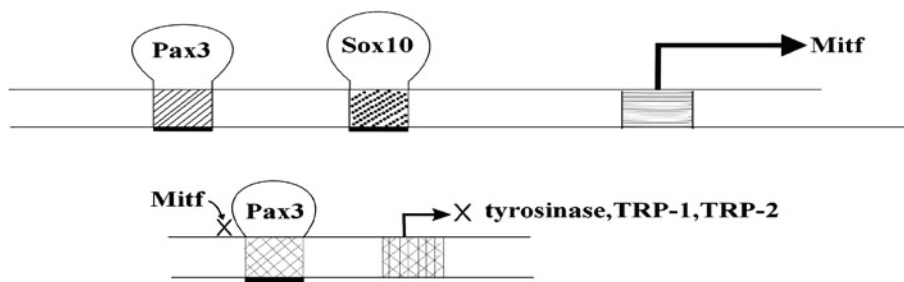


Figure 19 Régulation de *MITF* par *PAX3* et *SOX10*. (D'après Wan P., *et al.*, 2011). *PAX3* et *SOX10* se lient au promoteur du gène *MITF* et activent ensemble son expression. Simultanément, *PAX3* se lie sur les séquences promotrices des gènes cibles de *MITF* (*TYR*, *TYRP1* et *DCT*) empêchant *MITF* de s'y lier et d'activer leur transcription.

CREB

CREB fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP qui ont la particularité de contenir une région basique riche en leucine. Cette glissière à leucine (leucine zipper) permet la dimérisation de la protéine et une reconnaissance spécifique à l'ADN. CREB interagit directement avec l'ADN par sa fixation aux éléments de réponse, dits séquences CRE (cAMP response element), induisant la transcription de ses gènes

cibles notamment : *FOS*, *CCND1*, et *MITF*. Les agents physiologiques d'élévation de l'AMPc, tels que : l' α -MSH et l'ACTH, activent la voie de la protéine kinase A (PKA) pour phosphoryler CREB au niveau de la sérine-133. Une fois activé, CREB lie le motif consensus d'élément de réponse de l'AMPc, situé à -140 pb et à -147 pb du site de transcription du gène *MITF*, pour augmenter l'expression du gène *MITF* (Bertolotto C. *et al.*, 1998). De plus, l'irradiation UVB conduit à la phosphorylation de CREB dépendante de la MAPK p38 sur la sérine-133 et à l'activation de CREB (Saha B. *et al.*, 2006). Les niveaux de α -MSH dans la peau sont influencés par les rayonnements UV, les cytokines immunitaires ainsi que d'autres facteurs (Slominski A. *et al.*, 2000). L' α -MSH et les rayonnements UV peuvent tous deux initier l'activation du CREB suivie par la régulation positive de *MITF*. (Figure 20)

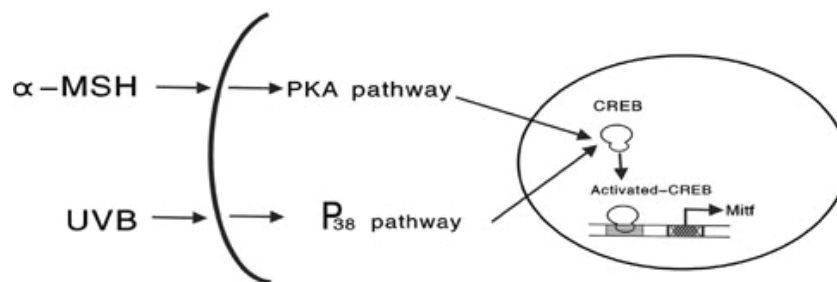


Figure 20 Régulation de *MITF* par CREB (D'après Wan P. *et al.*, 2011)

LEF-1

LEF-1 (Lymphoid enhancer factor-1) est un facteur de transcription impliqué dans la voie de transduction du signal Wnt. La stabilité de la β -caténine cytoplasmique est accrue par la liaison des protéines Wnt à leurs récepteurs et conduit au transport de la β -caténine dans le noyau où elle régule la transcription du *MITF* par le biais d'interactions avec les facteurs de transcription LEF / TCF (T cell factor). Des études sur les mélanocytes indiquent que β -caténine et LEF1 régulent de manière synergique l'expression du promoteur *MITF-M* via les sites de liaison de LEF1 (Takeda K. *et al.*, 2000). MITF interagit

physiquement avec LEF-1 pour initier et maintenir la transcription du gène *DCT* (Yasumoto K. *et al.*, 2002).

SOX9

L'activité du facteur de transcription SOX9, dans les mélanocytes adultes, dépend de la voie de l'AMPc. En réponse aux UVB, les kératinocytes environnants sécrètent de l' α -MSH qui active le récepteur MC1R, la voie de l'AMPc et la PKA conduisant à une régulation positive de SOX9 et de CREB. Ces derniers régulent ensuite le promoteur de *MITF*. SOX9 et MITF agissent alors ensemble pour réguler le promoteur *DCT* (Passeron T. *et al.*, 2007).

(Figure 21)

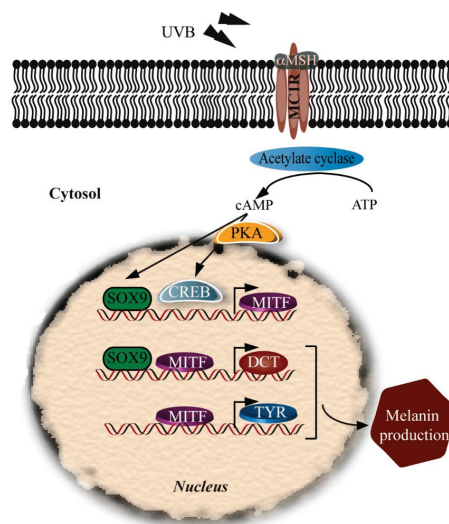


Figure 21 Rôle de SOX9 dans la régulation de MITF. (D'après D'Mello S. *et al.*, 2016)

ONECUT2

ONECUT2 appartient aux facteurs de transcription ONECUT qui possèdent un homéodomaine. Il est exprimé dans les mélanocytes et régule *MITF* en se fixant à son promoteur (Jacquemin *et al.*, 2001).

Régulation post-traductionnelle de MITF

MITF n'est pas seulement régulé transcriptionnellement mais subit, également, des modifications post-traductionnelles (phosphorylations par les MAPK, AKT, GSK3 et P38, acétylations, ubiquitinations et SUMOylations) qui vont moduler son activité en réponse à des stimuli spécifiques.

Le RTK c-Kit active les MAPK qui vont phosphoryler MITF sur son résidu sérine 73 (Hemesath TJ. *et al.*, 1998). Cette phosphorylation est responsable de l'ubiquitination de MITF et de sa dégradation par le protéasome. Dans les mélanocytes primaires humains, l'activation de la voie des MAPK, par ajout de BRAFV600E exogène, réprime l'expression de *MITF*. De plus, les inhibiteurs de BRAF et de MEK augmentent l'expression de *MITF* et de ses cibles.

Des essais kinases, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que AKT pouvait phosphoryler MITF sur sa sérine 510, conduisant à sa dégradation par le protéasome (Wang C. *et al.*, 2016).

D. CLEC12B : un récepteur CTLR

1. CTLRs

a. Classification et structure

Les CTLRs (C-Type Lectin Receptors) sont une large famille de plus d'un millier de protéines solubles et transmembranaires réparties en 17 groupes selon leur phylogénie ou leur organisation structurale. (Figure 22) Originellement, le terme C-type lectin a été introduit pour identifier les lectines possédant un domaine CRD (carbohydrate recognition domain) constitué de motifs de résidus conservés permettant la liaison aux glucides de manière Ca^{2+} dépendante (Drickamer K., 1988). Certains récepteurs classés parmi les CTLR possèdent un domaine similaire au CRD mais ne contiennent pas les résidus nécessaires à la complexation des ions calcium et à la liaison aux glucides. Ces domaines ont été nommés CTLD pour « C-Type Lectin-like Domain » (Weis WI. *et al.*, 1998).

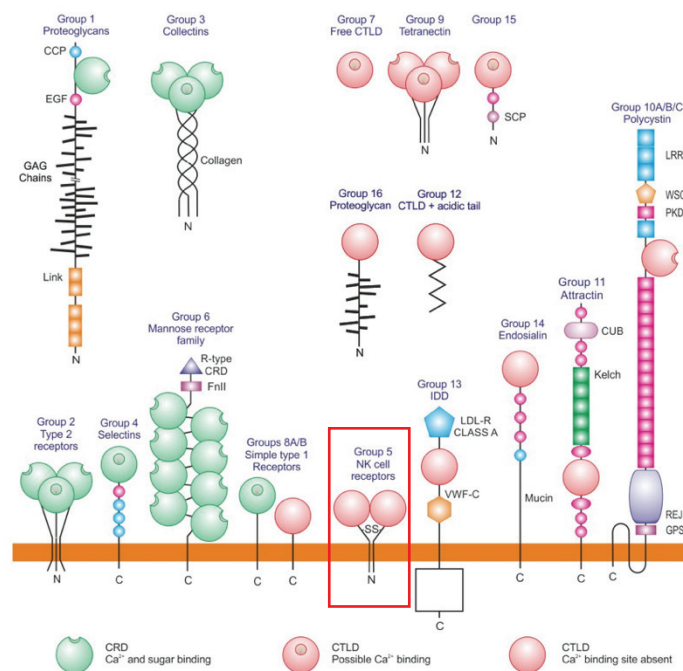


Figure 22 Classification des CTLR, D'après Imperial College London C-type Lectins.

Une analyse informatique, basée sur la phylogénie, a permis la classification de CLEC12B au sein du groupe V. Aussi appelé groupe des NK cell receptors, il inclut, néanmoins, des récepteurs exprimés dans d'autres types cellulaires comme : LOX-1 (exprimé par les cellules endothéliales) ou Dectin-1 (exprimé dans les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques). Tous les récepteurs appartenant au groupe V possèdent un domaine CTLD dont le site de liaison au calcium est absent. Dans certains cas, ils possèdent des résidus cysteines impliqués dans des liaisons covalentes (ponts disulfure) permettant aux récepteurs de s'homo-dimériser ou de s'hétéro-dimériser.

b. Ligands et fonctions biologiques

Les CTLRs sont une famille de récepteurs ayant un rôle important dans la reconnaissance de ligands endogènes et exogènes. Ne se limitant pas à la liaison aux glucides, certains CTLRs peuvent reconnaître une grande variété de ligands, notamment des lipides et des protéines, mais également, des molécules inorganiques (Gringhuis, 2009). Les CTLRs utilisent des voies de signalisation variées et sont capable de médier un ensemble très divers de réponses cellulaires, développementales, homéostatiques et immunitaires.

c. Potentiel thérapeutique des CTLRs

L'exploitation des CTLRs et de leurs voies de signalisation offre de considérables perspectives pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques. Les CTLRs peuvent s'avérer être de très utiles biomarqueurs et servir d'outils de diagnostic de certaines pathologies. Par exemple, le niveau de MBL (mannose-binding lectin) dans le sérum peut être quantifié afin de prédire une susceptibilité aux maladies auto-immunes ou infectieuses (*Figure 23 a*). Certains CTLRs peuvent augmenter

l'efficacité de vaccins grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à des antigènes ciblant des CTLRs à la surface de cellules dendritiques (par exemple : DEC205 ou DNGR1) (Kato Y. *et al.*, 2015) ou par l'utilisation de ligands de CTLR synthétiques comme le trehalose dibehenate (TBD) qui est un agoniste de MINCLE (macrophage-inducible C-type lectin) (Ostrop J. *et al.*, 2015). (Figure 23 b)

Certains ligands de CTLRs, comme le β -glucan, peuvent induire une immunité innée par laquelle une protection immunitaire à long terme est induite par des modifications épigénétiques dans les monocytes et les macrophages (Van der Meer JW. *et al.*, 2015). (Figure 23 c)

Le traitement avec des β -glucans induit une protection contre le cancer en stimulant l'apoptose de neutrophiles immunosuppresseurs dérivés de cellules myéloïdes (MDSC) et en convertissant des monocytes immunosuppresseurs dérivés de cellules myéloïdes en potentielles cellules présentatrices d'antigène (APC). Il permet ainsi une réponse anti tumorale médiée par les lymphocytes T CD4 et CD8 (Albeituni SH. *et al.*, 2016). (Figure 23 d)

Il semble pouvoir exister un bénéfice à l'utilisation d'antagonistes de CTLRs. Par exemple, les antagonistes de LOX-1 préviennent l'absorption de cholestérol LDL oxydé (low-density lipoprotein) par les cellules endothéliales vasculaires (événement clef dans la formation de plaques athérosclérotiques) (Thakkar S. *et al.*, 2015). (Figure 23 e)

L'inhibition de voies de signalisation de CTLRs peut, tout autant, induire des réponses protectives. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de la protéine kinase JNK1 (aussi appelée MAPK8), qui est activée par le CTLR Dectin-1, peut améliorer la réponse immunitaire contre le champignon pathogène *Candida Albicans* par l'activation du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) (Figure 23 f).

Pour le moment, peu de molécules ciblant les CTLRs ont été développées mais des études *in silico* montrent un très fort potentiel thérapeutique (Aretz J. *et al.*, 2014).

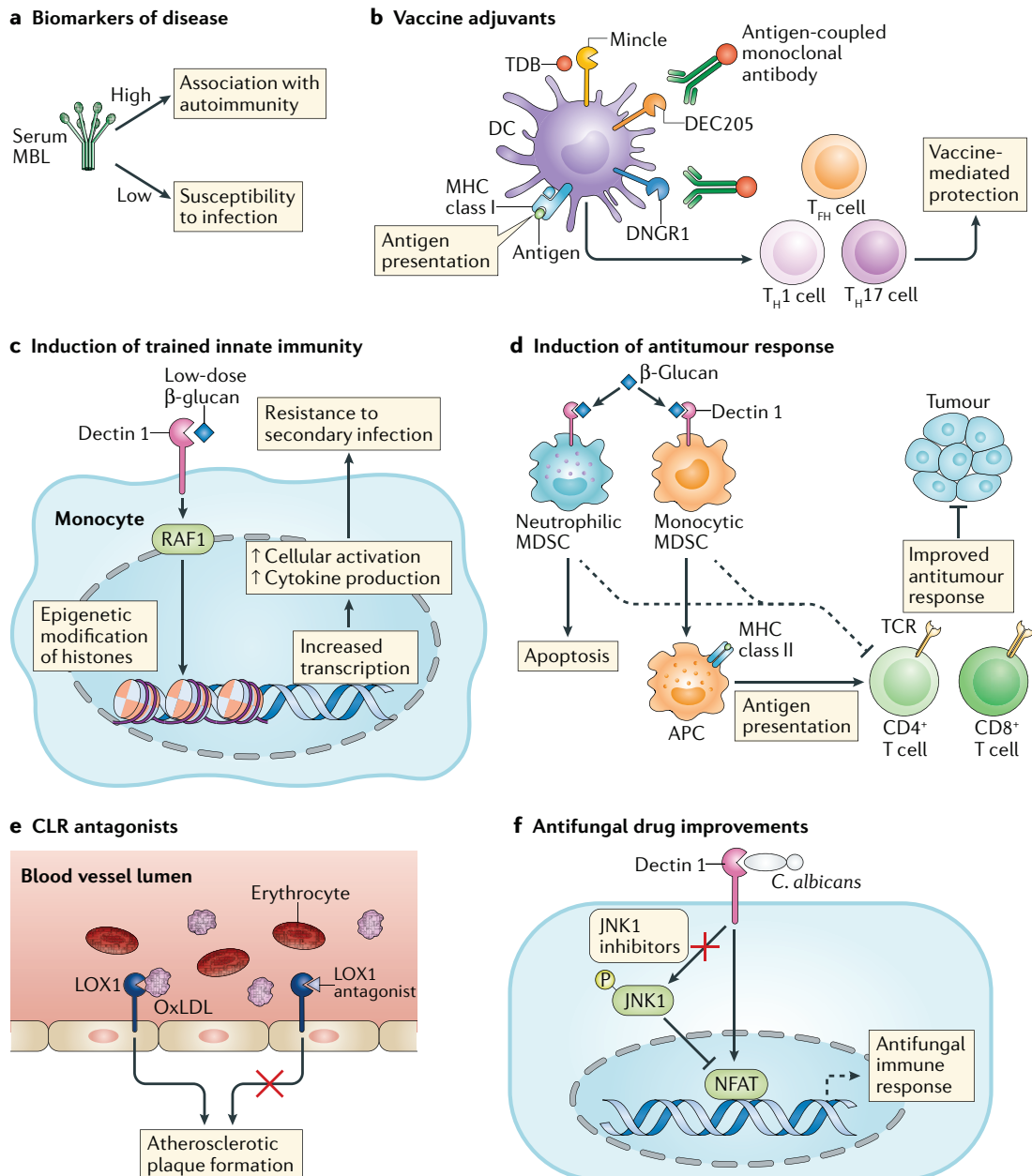


Figure 23 Potentiel thérapeutique des CTLRs. (D'après Gordon D. Brown *et al.*, 2018)

2. Le cluster de gènes Dectin-1

Localisé sur le chromosome humain 12p13.1, *CLEC12B* appartient, plus précisément, au cluster de gènes Dectin-1 dont les autres membres sont : *CLEC12A* (aussi appelé *MICL*), *CLEC2*, *CLEC9A*, *CLEC1*, *CLEC7A* (aussi appelé *Dectin-1*) et *Lox1*. (Figure 24)

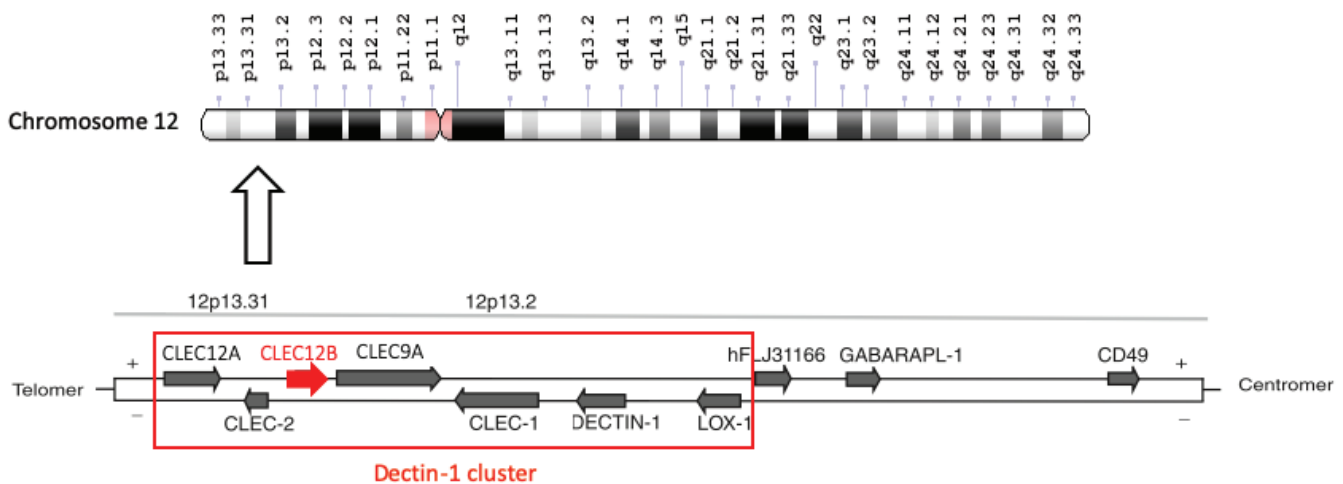


Figure 24 Représentation schématique des gènes appartenant au Dectin-1 cluster situé sur le chromosome humain 12.

Les membres du cluster de gènes dectin-1 codent pour des récepteurs transmembranaires de type II qui possèdent :

- un domaine unique CTLD extracellulaire ;
- une région transmembranaire ;
- un domaine cytoplasmique contenant des motifs de signalisation variés.

Ils peuvent être divisés en 3 sous-groupes en fonction de leur motif intracellulaire. Dectin-1, CLEC-9A et CLEC-2 contiennent un motif de signalisation activateur appelé ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activatory motif), CLEC12A et CLEC12B contiennent un motif inhibiteur ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) alors que CLEC-1 et LOX-1 contiennent des motifs encore non caractérisés. (Figure 25)

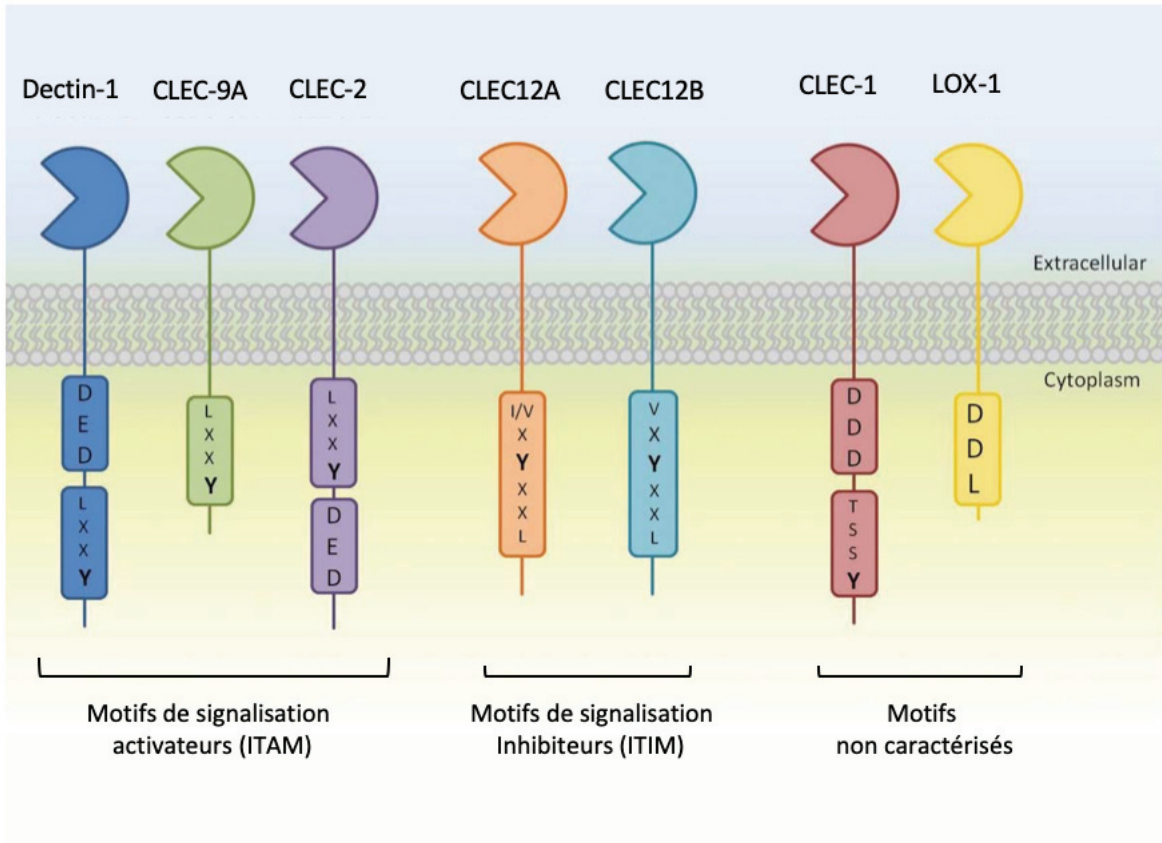


Figure 25 Représentation schématique des CTLRs appartenant au Dectin-1 cluster. (D'après Plato A. et al., 201).

A : Récepteurs activateurs Dectin-1, CLEC-2 et CLEC-9A contenant un domaine ITAM et à l'exception de CLEC-9A un motif de 3 acides aminés importants pour la signalisation cellulaire. B Récepteurs inhibiteurs CLEC12A et CLEC12B contenant le motif ITIM canonique. C : Récepteurs CLEC1 et LOX-1 contenant de nouveaux motifs non caractérisés.

Ces motifs conditionnent la signalisation et la fonction de chacun de ces récepteurs.

3. Récepteurs à domaine ITAM

a. Motif ITAM et signalisation

Les motifs ITAM ont été originellement identifiés en 1995, dans le domaine intracytoplasmique d'immuno-récepteurs, notamment : TCR (T cell receptor), BCR (B cell receptor) et FcR (Fc receptors) (Cambier J.C. et al., 1995).

La séquence consensus du motif ITAM est une courte séquence contenant 2 tyrosines (Y) suivies par une leucine (L) ou isoleucine (I) en position Y+3, séparées par 6 à 12 acides aminés : [YxxI/LX(6-12)YxxI/L] (Plato *et al.*, 2013). Lors de la liaison du ligand au récepteur portant un motif ITAM, les résidus tyrosine du motif sont phosphorylés par un membre de la famille des kinases Src permettant ainsi aux 2 domaines SH2 (Src homology 2) de la protéine kinase Syk (spleen tyrosine kinase) de se lier au domaine ITAM. (Figure 26A)

L'interaction de la protéine Syk avec le domaine ITAM entraîne son changement de conformation conduisant à son activation. Une fois activée, la protéine kinase Syk va phosphoryler une grande variété de substrats et activer de nombreuses voies de signalisation impliquées notamment dans : la réorganisation du cytosquelette d'actine, la production de ROS, la différenciation, la prolifération, la survie et la production de cytokines (Moscai *et al.*, 2010). (Figure 26C)

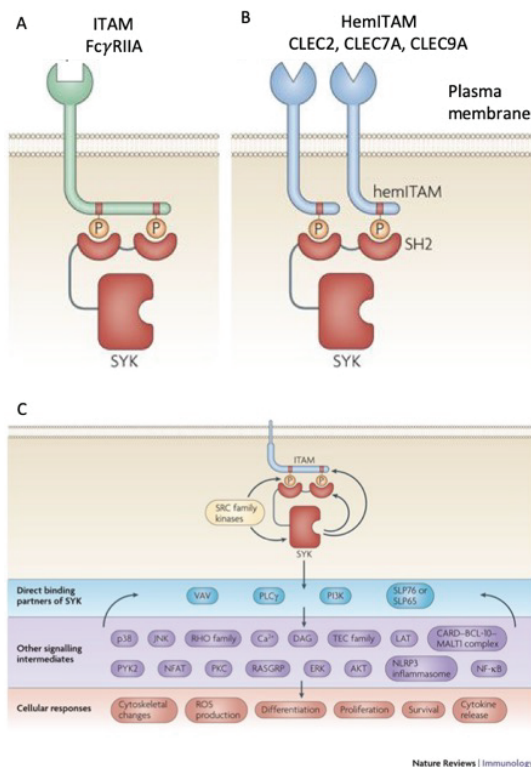


Figure 26 Motif ITAM et signalisation Syk. (Figure adapté à partir de « The Syk tyrosine kinase : a crucial player in diverse biological functions » Moscai *et al.*,2010)

CLEC7A (Dectin-1), CLEC9A et CLEC2 font partie d'un petit groupe de récepteurs qui ne possèdent qu'une partie du motif ITAM contenant une seule tyrosine : [YxxI/L], appelé HemITAM ou ITAM-like. Ils sont cependant tout aussi capables d'activer la kinase Syk qui forme alors un pont entre 2 récepteurs qui contiennent chacun une tyrosine. (Figure 26B)

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et prévenir d'éventuelles réponses inappropriées, l'activation des voies de signalisation dépendantes de Syk par les récepteurs activateurs contenant un motif ITAM est contrebalancée par des récepteurs inhibiteurs (Long E.O., 2008).

a. CLEC7A (Dectin1)

Le récepteur CLEC7A est le récepteur le mieux caractérisé du groupe Dectin1. Lors de son identification comme étant une molécule spécifique des cellules dendritiques (DC), il a été nommé Dectin 1 pour « Dendritic-cell-associated C-type lectin-1 » (Ariizumi *et al.*, 2000). Malgré son nom, il n'est pas exclusivement exprimé par les cellules dendritiques mais, également, par d'autres types cellulaires dont principalement : les macrophages, les neutrophiles et les monocytes et, plus faiblement, dans une sous classe de cellules T, dans les cellules B, les mastocytes et les éosinophiles (Brown, 2006). Il est épissé alternativement, générant 2 isoformes majeurs ainsi que des isoformes mineurs qui ont des fonctionnalités différentes. Il reconnaît spécifiquement des β -glucans provenant de sources différentes telles que : les levures, les bactéries, les champignons et les plantes. (Palma *et al.*, 2006 ; Adams *et al.*, 2008). La détermination de la structure cristallographique du domaine CTLD de Dectin1, ainsi que des analyses mutationnelles, ont montré que 2 résidus (Trp²²¹ et His²²³) sont requis pour la liaison aux β -glucanes et forment un sillon dans le CTLD qui correspondrait au site de liaison (Aldachi *et al.*, 2004 ; Brown *et al.*, 2007). À la suite de sa liaison, Dectin1 induit une vaste gamme de réponses

cellulaires comme : la phagocytose ou l'endocytose, la production de ROS, la maturation des cellules dendritiques ou la production de chimiokines et de cytokines (Brown, 2006).

b. CLEC2

CLEC-2 est exprimé dans les plaquettes, les mégacaryocytes et les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques. Une analyse (RT)-PCR montre que le récepteur peut aussi être exprimé dans les monocytes, les cellules dendritiques et les granulocytes (Colonna M. *et al.*, 2000 ; Chaipan C. *et al.*, 2006).

Chez la souris, trois isoformes ont été décrits. Ils possèdent des profils d'expression différents et des localisations subcellulaires différentes. La forme complète de CLEC-2, chez la souris, est clivée protéolytiquement à la membrane, ce qui génère une forme soluble (Xie *et al.*, 2008).

Via son domaine ITAM, CLEC-2 recrute la kinase SYK et déclenche l'activation et l'agrégation des plaquettes (Suzuki-Inoue *et al.*, 2006). En plus de SYK, il a été montré que les kinases Src, PLC γ et Rac1 sont également impliquées dans la voie de signalisation activée par CLEC-2 (Fuller *et al.*, 2007 ; Pleines *et al.*, 2008). Un certain nombre de ligands endogènes et exogènes de CLEC-2 ont été identifiés, y compris la toxine du venin de serpent : la rhodocytine (Suzuki-Inoue *et al.*, 2006). CLEC-2 peut aussi lier le VIH-1 et peut capturer et transférer le VIH-1 infectieux en collaboration avec DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule -3- grabbing non integrin) (Chaipan *et al.*, 2006). Un ligand endogène, la podoplanine, a également été identifié. (Suzuki-Inoue *et al.*, 2007). La podoplanine est une sialoglycoprotéine de type mucine qui est exprimée sur divers types de cellules, sauf sur l'endothélium du vaisseau sanguin, et qui est impliquée dans l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales, la métastase de la tumeur et la formation de vaisseaux lymphatiques. Il a été suggéré que l'interaction de CLEC-2 avec la podoplanine, qui implique des O-glycans, pourrait contribuer à la croissance tumorale

et/ou à la métastase et pourrait donc être une cible thérapeutique (Suzuki-Inoue *et al.*, 2007; Christou CM. *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2008). Malgré l'identification de tous ces ligands, le rôle physiologique de CLEC-2 demeure inconnu.

c. CLEC9A

CLEC9A (aussi appelé DNGR1) est le plus récent récepteur caractérisé du groupe Dectin-1. Il est exprimé dans de nombreux tissus, tel que déterminé par l'analyse RT-PCR (Caminschi I. *et al.*, 2008 ; Huysamen *et al.*, 2008). Dans le sang périphérique, CLEC9A se trouve principalement à la surface des cellules dendritiques BDCA3+, bien que ce récepteur ait également été détecté sur de petits sous-groupes de monocytes et de cellules B. Chez la souris, il existe au moins cinq isoformes de CLEC9A générées par épissage alternatif. CLEC9A est exprimé sur des cellules dendritiques CD8+, qui sont considérées comme équivalentes aux cellules BDCA3+ humaines, et aussi, à de faibles niveaux, sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les isoformes humaines de CLEC9A, et certaines de souris, sont exprimées à la surface cellulaire sous forme de dimères glycosylés.

La queue cytoplasmique du CLEC9A contient un domaine ITAM, ce qui suggère que CLEC9A peut fonctionner comme récepteur activateur. En effet, grâce à l'utilisation de récepteurs chimères dans des cellules myéloïdes transfectées, il a été démontré que CLEC9A était capable d'induire la production de cytokines inflammatoires par l'intermédiaire de la kinase SYK (Huysamen *et al.*, 2008). Bien que ce récepteur ne participe pas à l'absorption des particules par phagocytose, il a été montré que CLEC9A est capable d'internaliser les antigènes par endocytose pour les diriger vers la voie endosomale/lysosomique (Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). Cependant, on ne connaît toujours pas le ou les ligand(s) ainsi que la fonction physiologique de ce récepteur.

4. Récepteurs à domaine ITIM

a. Identification du motif ITIM

Le motif ITIM a été découvert, pour la première fois, dans une famille de récepteurs de faible affinité pour les immunoglobulines G (IgG) nommée : Fc γ RIIB. Les récepteurs aux IgG étaient déjà connus pour inhiber l'activation des cellules B lorsqu'ils sont co-engagés avec le récepteur BCR et forment un complexe sur la même cellule (Sinclair NR. *et al.*, 1971). Lorsqu'il a ensuite été montré que les récepteurs Fc γ RIIB n'inhibaient pas seulement l'activation des cellules B par les BCR mais également l'activation des cellules T par le TCR ou l'activation des mastocytes par les FcR (Daeron M. *et al.*, 1995 ; Daeron M. *et al.*, 1995), il est devenu clair que leurs propriétés inhibitrices n'étaient pas restreintes au contrôle de l'activation des cellules B mais qu'ils pouvaient exercer une grande variété de fonctions régulatrices via l'inhibition d'activations cellulaires par des récepteurs contenant un motif ITAM (Daeron M. *et al.*, 1995). Par la suite, il a été montré que les récepteurs Fc γ RIIB régulent la prolifération cellulaire, elle-même stimulée par les récepteurs aux facteurs de croissance qui possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK) (Malbec O. *et al.*, 1999). Dans tous les cas, les récepteurs Fc γ RIIB ont besoin d'être co-engagés avec des récepteurs activateurs et de partager un ligand extracellulaire commun pour fonctionner comme récepteur inhibiteur (Daeron M. *et al.*, 1995). L'analyse moléculaire des séquences intra-cytoplasmiques du récepteur Fc γ RIIB a révélé l'existence d'un résidu tyrosine suivi d'une leucine en position Y+3. Une mutation ponctuelle de cette tyrosine abolit les propriétés inhibitrices de Fc γ RIIB (Daeron M. *et al.*, 1995). L'acronyme ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) a alors été proposé pour définir ce nouveau motif.

Des récepteurs KIR (killer cell Ig superfamily receptors), qui reconnaissent le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC), ont ensuite rapidement été découverts à la surface des cellules NK. Leurs domaines intra-cytoplasmiques contenaient, eux aussi, des motifs ressemblants à la séquence ITAM (Colonna M. *et al.*, 1995). Il s'agissait, plus précisément, de 2 courts motifs [YxxL] séparés par 26 acides aminés. L'espace trop important entre ces 2 motifs ne permettait pas aux 2 domaines SH2 de la kinase Syk de s'y lier (Hatada MH. *et al.*, 1995). L'hypothèse de 2 domaines ITIM a alors été émise (Olcese L. *et al.*, 1996). Cette hypothèse a été confirmée de nombreuses façons (Olcese L. *et al.*, 1996 ; Burshtyn DN. *et al.*, 1996) notamment par l'expression du récepteur murin Fc γ RIIB sauvage (WT) ou muté dont le domaine intra-cytoplasmique a été remplacé par celui de KIR2DL3 dans des cellules de leucémie à basophiles de rat (RBL-2H3). Lorsque les récepteurs sauvage ou muté sont co-engagés avec des récepteurs IgE (Fc ϵ RI) exprimés par ces cellules, les 2 :

- inhibent la libération de médiateurs induite par les IgE (Blery M. *et al.*, 1997) ;
- sont phosphorylés sur leurs tyrosines ;
- recrutent des phosphatases contenant des domaines SH2.

Cependant, le récepteur Fc γ RIIB sauvage et celui dont le domaine intra-cytoplasmique a été remplacé par celui de KIR2DL3 recrutent des phosphatases différentes. Le premier recrute une phosphatase SHIP (Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1), alors que le récepteur chimère Fc γ RIIB-KIR recrute les 2 SHP (SH2 domain-containing tyrosine phosphatase) (Olcese L. *et al.*, 1996 ; Vély F. *et al.*, 1997 ; Ono M. *et al.*, 1997).

Sur la base de ces observations, le concept de régulation négative par des récepteurs contenant un domaine ITIM est devenu populaire et a généré de très nombreuses publications permettant ainsi la découverte et l'étude de nombreux autres

récepteurs inhibiteurs exprimés par une grande variété de types cellulaires et capables de réguler des réponses cellulaires variés. Comme le nombre de molécules contenant un motif ITIM a rapidement augmenté, une comparaison des séquences de leurs domaines intra-cytoplasmique a conduit à une définition plus précise du motif, comme étant une courte séquence contenant un seul résidu tyrosine suivi par un résidu hydrophobe (I, V ou L) en position Y+3 et précédé par un résidu hydrophobe moins conservé en position Y-2 (Vivier E. *et al.*, 1997). Cette définition structurale a été plus récemment confirmée grâce à une analyse extensive des propriétés de liaison d'une large librairie de peptides contenant un résidu tyrosine phosphorylé avec des domaines SH2 des phosphatases SHIP, SHP1 ou SHP2 (Sweeney MC. *et al.*, 2005). (Figure 27)

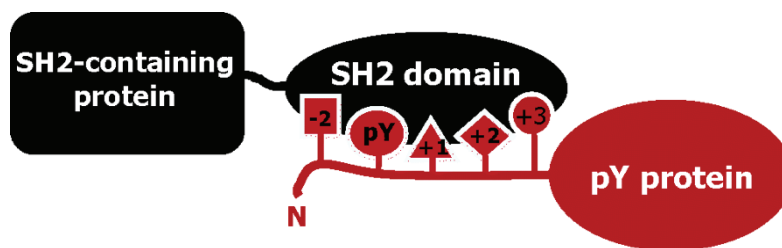


Figure 27 Séquence consensus du motif ITIM permettant la liaison au domaine SH2 des phosphatases SHIP, SHP1 ou SHP2. (D'après Sweeney MC. *et al.*, 2005)

La séquence consensus ITIM est donc un motif de 6 acides aminés [I/V/LxYxxL/V] capable de recruter des phosphatases contenant un domaine SH2, présent dans le domaine intra cytoplasmique de récepteurs transmembranaires ayant des propriétés inhibitrices lorsqu'ils sont co-engagés avec des récepteurs activateurs.

b. Motif ITIM et signalisation

La caractéristique des récepteurs à domaine ITIM est que la phosphorylation de leur tyrosine permet le recrutement de phosphatases contenant un domaine SH2 entraînant ainsi l'inhibition de voies d'activations cellulaires. En fonction du récepteur et de la phosphatase, les mécanismes de phosphorylation du motif ITIM, le mécanisme de recrutement et les conséquences de ce recrutement diffèrent. Quatre phosphatases contenant des domaines SH2 ont été identifiées : les deux inositol phosphatases SHIP1 et SHIP2 ainsi que les deux tyrosine phosphatases SHP1 et SHP2. Les CTLR du groupe V, dont font partie CLEC12A et CLEC12B, recrutent uniquement les phosphatases SHP1 et SHP2.

c. CLEC12A

CLEC12A est aussi appelé MICTL pour « myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor » (Marshall *et al.*, 2004), CCL1 pour « C-type lectin-like molecule 1 » (Bakker *et al.*, 2004) ou encore DCAL-2 pour « Dendritic cell-associated lectin-2 » (Chen *et al.*, 2006). CLEC12A est principalement exprimé à la surface des cellules myéloïdes dont les macrophages, monocytes, granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et les cellules dendritiques. Il est faiblement exprimé dans les lymphocytes et les cellules NK (Marshall *et al.*, 2004 ; Bakker *et al.*, 2004).

CLEC12A est épissé alternativement. Une analyse RT-PCR de leucocytes de sang périphérique a permis l'identification de 3 isoformes : CLEC12A- α , CLEC12A- β et CLEC12A- γ (Marshall *et al.*, 2004). Leur structure prédictive a été décrite après clonage et séquençage. (Figure 28)

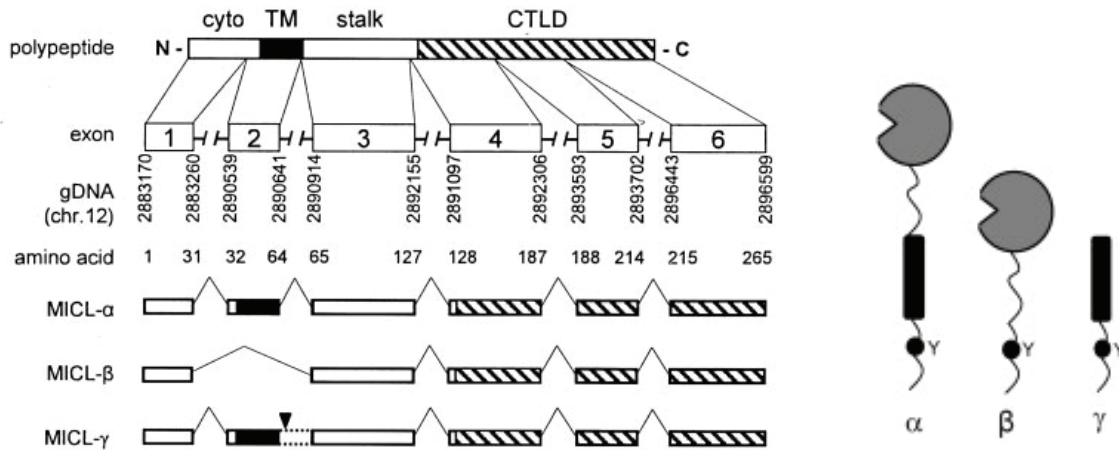


Figure 28. Structure génomique et différents isoformes de CLEC12A. (D'après Marshall ASJ., et al., 2004)

Le variant d'épissage 1 code pour l'isoforme α qui est la forme complète. Le variant 2, qui correspond à l'isoforme β , a perdu l'exon 2 qui code pour la région transmembranaire. Dans le 3ème variant, codant pour l'isoforme γ , le deuxième intron n'a pas été épissé. Il en résulte l'introduction d'un codon stop causant la perte du domaine CTLD extracellulaire. Cependant, la pertinence fonctionnelle de ces différents isoformes n'a pas été étudiée. CLEC12A contient des résidus cystéine, conférant au récepteur la capacité de se dimériser. Seule l'isoforme murine se dimérise, alors que l'isoforme humaine est exprimée sous forme de monomère. CLEC12A possède 6 sites de N-glycosylation et il a été montré que la glycosylation de CLEC12A augmentait au cours de la différenciation des macrophages (Marshall *et al.*, 2006). Cependant, l'importance fonctionnelle du niveau de glycosylation de CLEC12A, à savoir si par exemple cela impacterait son affinité aux ligands ou à d'autres récepteurs, n'a pas été déterminée. Il a été montré que CLEC12A est régulé transcriptionnellement de manière négative suite à la stimulation de TLR (Toll like receptor) *in vitro* et son expression dans les granulocytes et monocytes diminue lors de leur recrutement au site inflammatoire (Marshall *et al.*, 2006).

À l'heure actuelle, le ligand de CLEC12A n'a toujours pas été identifié. Cependant, la forme soluble de CLEC12A a été utilisée pour rechercher des ligands potentiels dans de nombreux tissus différents révélant une liaison dans la moelle osseuse, le thymus, le cœur, la rate et le rein. Cette reconnaissance généralisée suggère que CLEC12A pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie (Huysamen C. et Brown GD. 2009).

CLEC12A est également exprimé sur les cellules de leucémie myéloïde aiguë (AML) où il est utilisé comme marqueur diagnostique. Seuls 30 à 40 % des patients atteints de AML survivent en raison de la tolérance de ce type de cellule à la chimiothérapie lors de la rechute. Des progrès récents dans l'utilisation de CLEC12A comme cible thérapeutique ont impliqué le développement d'anticorps cytotoxiques anti-CLEC12A pour cibler les cellules dérivées de l'AML. Ces anticorps ont montré une forte cytotoxicité à l'égard de 94 % des cellules dérivées de l'AML, démontrant une approche prometteuse du traitement de l'AML en utilisant CLEC12A comme cible (Van Rhenen A. *et al.*, 2007 ; Zhao X. *et al.*, 2009).

Il est particulièrement intéressant de noter la capacité de CLEC12A à réguler les réactions d'activation en aval des PRR, y compris les TLR et les CTLR, car cela aurait des effets directs sur la réponse cellulaire pendant l'invasion pathogène. Comme nous l'avons vu plus haut pour les ITIM, CLEC12A recrute SHP-1 et SHP-2 par l'intermédiaire de leurs domaines SH2 à la tyrosine phosphorylée du domaine ITIM, et cette voie est censée servir de médiateur dans la fonction inhibiteur de ce récepteur. (*Figure 29*)

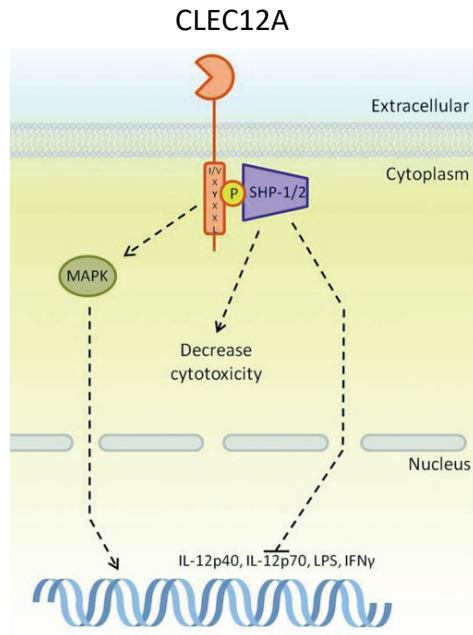


Figure 29 Signalisation de CLEC12A via son domaine ITIM et le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2. (D'après Plato A. et al., 2013)

La fonction inhibitrice de CLEC12A a été démontrée directement à l'aide d'une fusion du CTLD de Dectin-1 avec la queue de signalisation de CLEC12A. Lorsque ce récepteur chimérique CLEC12A/Dectin-1 a été co-exprimé avec la forme complète de Dectin-1, la signalisation CLEC12A a pu inhiber l'activation de Dectin-1 induite par le zymosan (Marshall AS. Et al., 2004). Au cours d'une autre étude, les effets de CLEC12A sur la production de cytokines et de chimiokines ont été étudiés. Il a été montré que CLEC12A supprime l'expression d'IL-12p40 et IL-12p70 induite par le zymosan et le TNF ainsi que l'expression du TNF induite par le LPS (Chen CH. et al., 2006). CLEC12A aurait également un rôle inhibiteur dans la cytotoxicité des cellules NK, où le blocage des ligands potentiels CLEC12A augmente la toxicité des NK (Han Y. et al., 2004). Cependant, et de façon contradictoire avec la fonction inhibitrice du domaine ITIM, il a été montré que CLEC12A pouvait activer la voie des MAPK via SHP2 et avoir ainsi un rôle activateur (Chang-Hung et al., 2006).

5. CLEC12B

a. Structure

CLEC12B présente une forte homologie de séquence avec CLEC12A (34% de similarité). Les deux récepteurs appartiennent au même groupe de CTLR (groupe V), sont situés sur le même chromosome (chromosome 12), dans le même cluster de gènes (cluster Dectin-1) dont ils sont les seuls à posséder un motif de signalisation ITIM dans leur domaine intracytoplasmique. Le gène *CLEC12B* a une taille de 9754 bases et code pour une protéine de 276 acides aminés. CLEC12B contient 3 sites potentiels de N-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr en position 91, 176 et 237), deux sites de phosphorylation (tyrosine en position 7 et sérine en position 184) et des résidus cystéine impliqués dans la formation de ponts disulfure.

CLEC12B est un récepteur transmembranaire de type II constitué par :

- Un segment N-terminal cytoplasmique (acides aminés 1-43) qui contient le domaine ITIM (tyrosine en position 7)
- Un segment transmembranaire (acides aminés 44-64)
- Un segment extracellulaire (acides aminés 65-276) qui contient le domaine CTLD.

b. Identification et fonction

CLEC12B a été identifié pour la première fois en 2007 par une équipe de l'institut d'immunologie de l'Université d'Heidelberg en Allemagne. L'équipe cherchait alors un homologue inhibiteur du récepteur NKG2D. NKG2D (codé par *KLRK1* localisé sur le chromosome 12) est un CTLR qui joue un rôle important dans l'activation des cellules NK. De nombreux récepteurs activateurs fonctionnent de pair avec des récepteurs inhibiteurs afin d'éviter des réactions immunes extrêmes à des menaces mineures. Ces hétéro-

dimères partagent une forte homologie de séquences de leur domaines extracellulaires, ainsi qu'une spécificité de ligands, mais des capacités de signalisation opposées (Taylor *et al.* 200 ; Lanier *et al.* 2001). La séquence d'ADNc complète de *CLEC12B* a été découverte au cours d'une recherche *in silico* d'homologie de séquence du domaine extracellulaire avec le récepteur NKG2D. (Figure 30) Cette séquence codait pour un récepteur transmembranaire de type II de 276 acides aminés (DQ368812) appartenant à la famille des CTLR (Hofer *et al.* 2001).

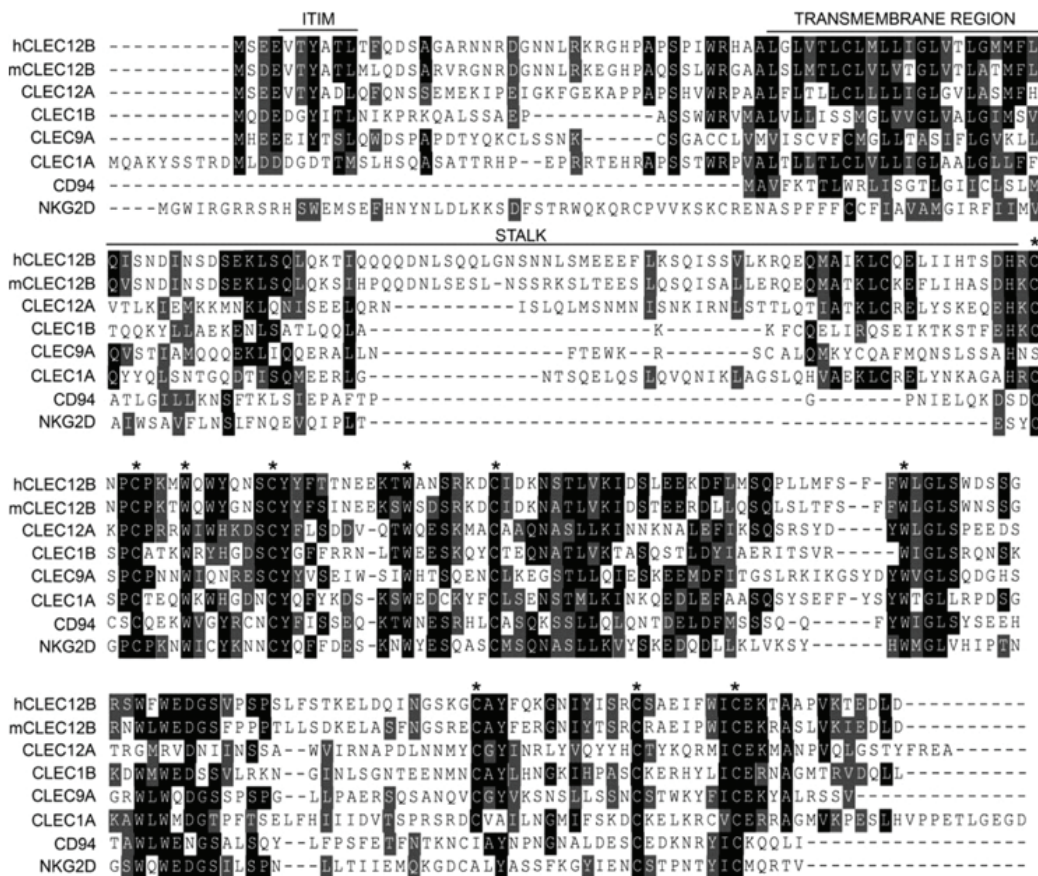


Figure 30 Alignement des séquences humaine et murine prédictives de *CLEC12B* avec les récepteurs CTLR *CLEC12A*, *CLEC1B*, *CLEC9A*, *CLEC1A*, *CD94* et *NKG2D*. Les asterisks indiquent les acides aminés identiques dans le domaine CTL. Les domaines intracellulaire ITIM, transmembranaire ainsi que le tige (stalk region) sont indiqués.

Des analyses de PCR ont montré l'expression de CLEC12B dans des bibliothèques d'ADNc humain préparées à partir de tissus variés : colon, cœur, rein, foie, poumons, glande mammaire, ovaires, rate et testicules, à l'exception du cerveau. De manière intéressante, les auteurs ont retrouvé, dans les ovaires et glandes mammaires uniquement, une forme tronquée de CLEC12B correspondant à un variant d'épissage dont l'exon 4 est manquant. L'exon 4 codant pour une partie du domaine CTL, la protéine issue de ce transcrit alternatif serait donc non fonctionnel. (Figure 31)

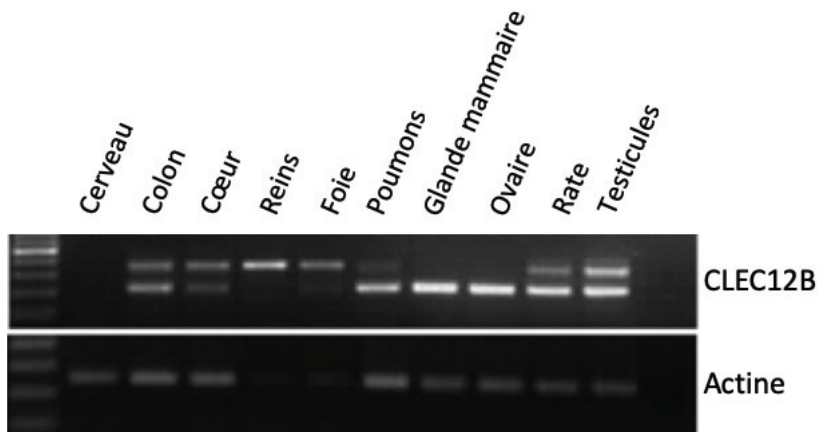


Figure 31 Analyse PCR de l'expression de CLEC12B dans divers tissus humains.

Cependant, lors de cette étude, l'expression de CLEC12B a été retrouvée dans des macrophages différenciés *in vitro* et dans des cellules U937 (lignée cellulaire issue de lymphome) stimulées à la PMA. Les macrophages étant dispersés dans la quasi-totalité des tissus du corps, cela pourrait expliquer les résultats de l'analyse PCR, à savoir : l'expression de CLEC12B retrouvée dans différents tissus. Aussi, il n'a pas été retrouvé d'expression de CLEC12B dans les cellules primaires T, les cellules primaires NK ou dans des lignées de cellules NK. De plus, il s'est avéré que CLEC12B ne partageait pas d'affinité

pour les ligands de NKG2D. Les auteurs ont donc conclu que CLEC12B ne pouvait pas être l'homologue inhibiteur de NKG2D dans les cellules NK.

Afin d'identifier le mécanisme de signalisation de CLEC12B, les auteurs ont généré un mutant du domaine ITIM en remplaçant le résidu tyrosine par une phénylalanine. Cette mutation permet d'abolir le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2 via la tyrosine phosphorylée du domaine ITIM de CLEC12B. (Figure 32)

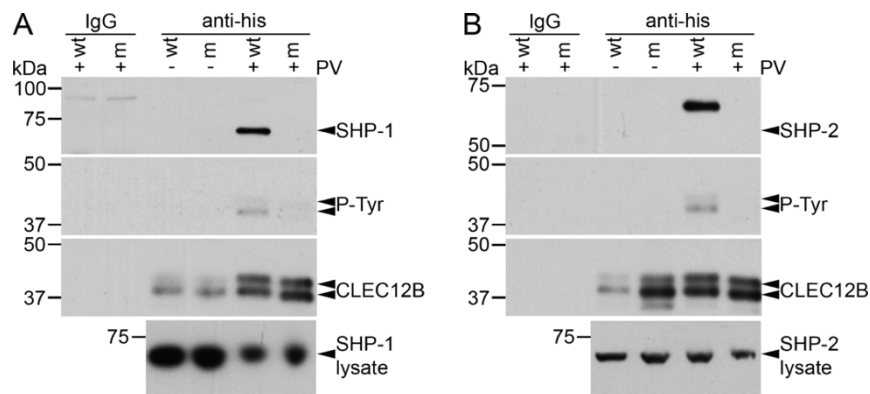


Figure 32 CLEC12B recrute SHP1 et SHP2 via son domaine ITIM.

Expérience de co-immunoprécipitation. Des cellules 293T ont été transfectées avec une forme sauvage (WT) ou mutante (m) de CLEC12B fusionnées avec une étiquette poly Histidine (His). Les cellules ont été traitées avec du pervanadate (PV). Les lysats ont été immunoprécipités avec des IgG contrôles ou un anticorps anti-His et analysés en Western Blot avec des anticorps anti-CLEC12B et anti-PhosphoTyrosine (P-Tyr).

Lors de l'analyse fonctionnelle, les auteurs ont montré que lorsqu'ils surexpriment CLEC12B dans des cellules NK, CLEC12B est un récepteur capable d'inhiber l'activation des cellules NK médiée par NKG2D. De manière intéressante, ils expliquent également que l'activité inhibitrice de CLEC12B n'est pas limitée à NKG2D et, qu'au contraire, CLEC12B serait capable d'inhiber une large gamme de voies de signalisation médiées par des récepteurs activateurs.

Plus récemment, une analyse protéomique de fibroblastes de souris KO pour la cavéoline 1 (CAV1), impliquée dans diverses fonctions cellulaires, notamment la signalisation cellulaire, le transport des lipides et le trafic membranaire, a identifié CLEC12B comme un partenaire d'interaction. La déplétion de CAV1 augmente l'expression protéique de CLEC12B. Les auteurs soulignent que les conséquences physiopathologiques de cette interaction entre CLEC12B et CAV1 restent à définir et à explorer. (Kulkarni et al., 2013).

À ce jour, une seule publication référencée sur pubmed, établit un lien entre CLEC12B et cancer (Derpoorter et al., 2019). Les auteurs de ce travail ont effectué un séquençage complet de l'exome à partir de l'ADN germlinal des parents et de 2 enfants de la famille, l'un atteint d'un ganglioneurome et l'autre d'un neuroblastome. Ils ont ainsi mis en évidence une mutation faux-sens affectant CLEC12B. Cette mutation affecterait une cystéine du domaine lectine C-terminal de CLEC12B et entrainerait des changements de conformation de la protéine.

E. Phosphatases et signalisation intra-cellulaire

1. La tyrosine phosphatase SHP1

a. Identification

La découverte de SHP-1 fut précédée par l'identification d'une mutation récessive chez des souris C57BL/6J, dans les laboratoires Jackson aux Etats-Unis, en 1965 (Dickie *et al.*, 1969). Ces souris étaient caractérisées par la présence de plaques cutanées dépourvues de pigmentation dès l'âge de 3 à 4 jours. On remarquait aussi l'absence ou la diminution du nombre de poils dans ces régions, ce qui donnait l'illusion que ces souris étaient mangées par les mites (d'où leur nom anglais Motheaten). À partir de la troisième

semaine de vie, des lésions cutanées se développaient sur leurs extrémités (pattes, oreilles) pouvant mener à la nécrose et même à la perte d'orteils. Ces animaux homozygotes étaient généralement plus petits que leurs homologues normaux (hétérozygotes) d'une même portée et étaient stériles. Finalement, la mortalité était accrue chez ces mutants qui avaient une longévité maximale de 8 semaines et une survie moyenne de 22 jours (Green et Shultz, 1975; Shultz et al., 1984). Les plaques cutanées étaient causées par une infiltration marquée de neutrophiles au niveau du derme, de l'épiderme et, plus profondément, jusqu'au muscle. Les souris *motheaten* souffraient de congestion pulmonaire hémorragique dès les premiers jours de vie. On remarquait une accumulation marquée de macrophage au niveau des alvéoles, de même que de quelques lymphocytes et plasmocytes. Cette congestion était la principale cause de décès chez ces animaux. Les souris *motheaten* souffraient également d'immunodéficience marquée et d'autoimmunité. En 1980, les Laboratoires Jackson firent la découverte d'une nouvelle mutation récessive chez les souris C57BL/6J. Celle-ci semblait être un allèle de la mutation *motheaten* (*me*) située sur le chromosome 6. Ces souris développaient les mêmes plaques cutanées et souffraient de congestion pulmonaire hémorragique. Comme leur durée de vie était en moyenne de 61 jours, avec un maximum de 25 semaines, elles ont été prénommées *viable motheaten* (*mev*). En dehors de leur longévité relativement accrue, ces souris semblaient avoir la même pathologie que les souris *motheaten*. En fait, la congestion pulmonaire prenait plus de temps à s'installer, ce qui augmentait leur temps de survie (Shultz et al., 1984).

Ce n'est qu'en 1993, que les mutations *motheaten* et *viable motheaten* ont été associées à un gène murin, celui de la SHP-1 (Tsui et al., 1993). Ces auteurs ont comparé le gène *HCP* (SHP-1) humain, situé sur le chromosome 12 (Plutzky et al., 1992; Yi et al., 1992), avec ceux des deux types de souris et de leur homologues sauvages. Ils ont

découvert que des transcrits anormaux de *SHP-1* étaient présents chez les souris *me* et *mev*. Une mutation ponctuelle, dans chaque cas, était responsable d'un épissage différent de l'ARNm. Chez les souris *me*, cette mutation occasionnait une délétion d'un segment du transcrit au niveau du premier domaine SH2 en N-terminal qui provoquait ensuite la création d'un codon stop prématuré et empêchait donc la production d'une protéine fonctionnelle. Pour ce qui est des souris *mev*, la mutation ponctuelle causait une délétion de 15 paires de bases ou une insertion de 69 paires de bases dans le cadre de lecture au niveau du domaine phosphatase de la protéine en C-terminal. Ces anomalies permettaient donc la production d'une protéine avec un domaine phosphatase altéré (Shultz et al., 1993). Une étude subséquente a démontré que, chez les souris *me*, SHP-1 n'était probablement qu'un polypeptide se terminant au niveau du premier domaine SH2 et que son ARNm ou la protéine elle-même n'étaient pas détectables. Dans le cas des souris *mev*, la protéine SHP-1 était bien présente, mais son activité phosphatase était grandement réduite pour n'atteindre que 10 à 20% de son niveau normal. (Kozlowski et al., 1993).

b. Structure, modes de reconnaissance et d'activation

Aussi nommée : SHPTP-1, HCP et PTP1C, SHP1 est une phosphotyrosine phosphatase (PTP) codée par le gène *PTPN6*. Elle est exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques, mais également dans les cellules musculaires lisses (Marrero et al., 1998b) et les cellules épithéliales (Banville *et al.*, 1995).

SHP-1 est codée par le gène *Hchp* (Hematopoietic Cell Phosphatase) chez la souris, situé sur le chromosome 6 et par le gène *PTPN6* (Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor type 6) chez l'humain, situé sur le chromosome 12 (Shultz *et al.*, 1997). Les deux gènes sont précédés de deux promoteurs permettant chacun la production d'un transcrit (Banville *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1999).

Le promoteur 1 est environ 7kb en amont du promoteur 2 et est actif dans les cellules non-hématopoïétiques alors que le promoteur 2 induit la transcription du gène chez les cellules hématopoïétiques (Banville *et al.*, 1995). Une autre étude conclue que, tant chez l'humain que chez la souris, on retrouve les deux types de transcrits dans les cellules hématopoïétiques, bien que celui produit par le promoteur 2 soit prédominant (Tsui *et al.*, 2002). Les deux transcrits seraient présents dans les cellules épithéliales murines, alors que seul le transcrit produit par le promoteur 1 se retrouverait dans les cellules épithéliales humaines. Le promoteur 1 a une séquence reconnaissant NF- κ B et deux boîtes E se liant aux facteurs de stimulation USF1/2. Le promoteur 2, quant à lui, possède un site se liant au facteur de transcription AP-2 (Banville *et al.*, 1995; Tsui *et al.*, 2002).

Finalement, la transcription du gène *SHP-1* semble induite suite à une stimulation aux phorbols esters (TPA et PMA) (Tsui *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 1993), possiblement via AP-2 (Imagawa *et al.*, 1987) et NF- κ B (Tsui *et al.*, 2002).

La protéine SHP-1 contient deux domaines SH2 (Src Homology 2 domain) dans sa portion N-terminale, un domaine phosphatase conservé en position centrale et une queue C-terminale (Yi *et al.*, 1992). Les domaines SH2 de la SHP-1 jouent deux rôles : la reconnaissance des substrats et l'autorégulation de l'activité de la PTP. Les domaines SH2 en général reconnaissent des protéines ayant une tyrosine phosphorylée suivie de trois à six acides aminés spécifiques faisant partie d'un motif conservé (Pawson, 1995; Songyang *et al.*, 1993). Dans le cas de SHP-1, ses deux domaines SH2 (N-SH2 et C-SH2) reconnaissent le motif ITIM. Lorsque la tyrosine centrale du motif est phosphorylée, le domaine SH2 reconnaît ce motif et peut s'y fixer (Pawson, 1995). L'acide aminé en -2 de la tyrosine est ce qui différencie la séquence reconnue par les SH2 de la SHP-1 des séquences reconnues par les SH2 des autres types de protéines (Burshtyn *et al.*, 1997). Le domaine N-SH2 joue

un rôle particulier dans l'activation de la SHP-1. En effet, il est lié au domaine phosphatase lorsque l'enzyme est inactive, bloquant ainsi l'entrée au site catalytique du domaine phosphatase (Martin et al., 1999; Pei et al., 1994; Pei et al., 1996; Townley et al., 1993; Yang et al., 2003). Le C-SH2 aurait un rôle de reconnaissance. Comme ce domaine est mobile, il agirait comme une « tête chercheuse » lorsque la SHP-1 est dans sa conformation inactive. Lorsque le C-SH2 se fixe à un domaine ITIM phosphorylé, cela provoque un changement de conformation qui permettrait ensuite au N-SH2 de se fixer lui aussi à un phosphopeptide ITIM. Ce deuxième attachement affaiblirait la liaison entre N-SH2 et le domaine phosphatase, ce qui favoriserait la dissociation entre ces deux domaines et activerait l'enzyme (Yang et al., 2003). Ce modèle d'activation est en accord avec deux études qui ont démontré qu'une SHP-1 manquant le C-SH2 serait moins active (Pei et al., 1993; Pei et al., 1996). (Figure 33)

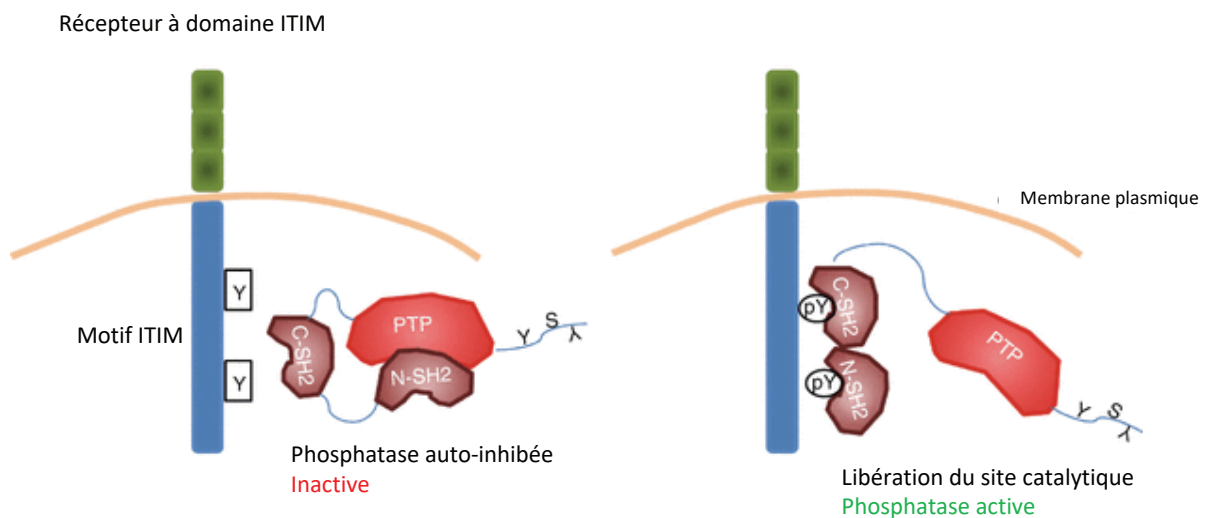


Figure 33 Conformation et activité catalytique de la phosphatase SHP1.

Le domaine phosphatase ou catalytique de la SHP-1 possède trois acides aminés essentiels regroupés dans son site actif : la Cys⁴⁵⁵ agit comme nucléophile et attaque le

substrat, l'Arg⁴⁵⁹ stabilise la charge négative de la phosphotyrosine du substrat et l'Asp⁴²¹ est le donneur et l'accepteur de proton (Yang et al., 1998).

Enfin, la SHP-1 est dotée de 2 tyrosines en position C-terminale (Tyr^{536/538} et Tyr⁵⁶⁴) pouvant être phosphorylées. La première étude concernant la phosphorylation de la SHP-1 date de 1992 et impliquait le CSF-1 sans spécifier quelle tyrosine était touchée (Yeung et al., 1992). Par la suite, certaines études ont démontré la phosphorylation de tyrosines spécifiques : Tyr⁵³⁸ suite à une stimulation à l'EGF (Bouchard et al., 1994), Tyr⁵³⁸ par le récepteur de l'insuline (Uchida et al., 1994) et Tyr⁵⁶⁴ par l'activité de la kinase Lck (Lorenz et al., 1994). Une de ces études liait la phosphorylation de la Tyr⁵³⁸ avec une hausse de l'activité catalytique de la SHP-1 (Uchida et al., 1994). Plus récemment, un article a suggéré que la phosphorylation de la Tyr⁵³⁶ (probablement le même résidu que la Tyr⁵³⁸) augmenterait l'activité catalytique de l'enzyme en permettant la liaison avec N-SH2 qui libèrerait le domaine phosphatase (Zhang et al., 2003). Cette même étude constate que la phosphorylation de la Tyr⁵⁶⁴ engage sa liaison avec C-SH2. Une dernière étude utilisant les neutrophiles affirme que la PKC pourrait aussi phosphoryler SHP-1 sur des résidus sérines et que cela inhiberait son activité enzymatique (Brumell et al., 1997).

c. Substrats de SHP-1

SHP-1 est responsable de la régulation négative de nombreuses voies de signalisation chez tous les types de cellules hématopoïétiques. C'est une PTP cytosolique qui peut agir de plusieurs façons :

- elle peut se lier à des récepteurs et les déphosphoryler directement ;
- elle peut se lier à un récepteur et déphosphoryler une autre protéine à proximité (souvent liée au récepteur elle aussi) ;

- elle peut s'attacher à une protéine cytosolique et la déphosphoryler directement ou déphosphoryler une protéine cytosolique via son attachement à une autre protéine cytoplasmique adaptrice qui fait un pont entre la SHP-1 et son substrat (Frearson et Alexander, 1997).

Les dérèglements immunitaires des souris *motheaten* et *viable motheaten* montrent que SHP-1 joue un rôle très important dans la régulation négative des lymphocytes B et T. SHP-1 inhibe l'activité du BCR et ainsi la prolifération, l'apoptose et la sélection négative qui en découle (Zhang et al., 2000a). Cette inhibition résulte de la déphosphorylation de plusieurs PTK telles Lyn et Syk par SHP-1 (Dustin *et al.*, 1999). Elle peut également impliquer certaines protéines membranaires qui lient SHP-1 et qui ont un effet négatif sur le BCR telles CD22 (Blasioli et al., 1999 ; Law et al., 1996), PIR-B (Wang et al., 1999) et CD72 (Adachi et al., 2001).

Au niveau des lymphocytes T, la SHP-1 est très importante dans l'inhibition de la signalisation découlant de l'activation du TCR et donc de la sélection des thymocytes et de l'apoptose (Zhang et al., 2000a). Elle est responsable, entre autres, de la déphosphorylation de p56lck (Chiang et Sefton, 2001), de ZAP-70 (Brockdorff et al., 1999) et de PI3K (Cuevas et al., 1999).

Dans les cellules NK, SHP-1 est reconnue pour s'attacher, via des motifs ITIM, à des récepteurs inhibiteurs de la signalisation cellulaire tels que KIR (Burshtyn et al., 1996; Olcese et al., 1996), gp49 (Wang et al., 1999) et Ly-49A (Nakamura et al., 1997). La liaison à chacun de ces récepteurs permet de moduler négativement la mort cellulaire causée par les cellules NK.

Comme le phénotype *motheaten* le suggère, SHP-1 joue un rôle important dans la suppression de nombreuses voies de signalisation reliées à la croissance cellulaire, à la survie, à l'activation, à la migration et à l'adhésion des cellules myéloïdes.

En ce qui concerne la croissance cellulaire, plusieurs études ont démontré l'importance de la SHP-1 dans l'inhibition du récepteur c-Kit impliqué dans la mitose (Kozlowski et al., 1998; Paulson et al., 1996). Les cellules souches de la moelle osseuse des souris *me* et *mev* répondent exagérément aux facteurs de croissance tels CSF-1 (Chen et al., 1996), GM-CSF (Jiao et al., 1997), G-CSF (Tapley et al., 1997) et IL-3 (Bone et al., 1997; Paling et Welham, 2002; Yi et al., 1993) qui sont très importants dans la survie, la différenciation et la prolifération des cellules myéloïdes.

À l'inverse, la SHP-1 est aussi impliquée dans le processus d'apoptose. En effet, elle semble causer l'apoptose induite par le TNF via l'inhibition de l'activité de la PTK Lyn chez les neutrophiles (Daigle et al., 2002) et, à l'opposé, semble protéger contre l'apoptose les cellules de rate de souris *me* irradiées aux rayons γ (Hsu et al., 2001).

La SHP-1 est aussi responsable de l'inhibition de certains mécanismes de défense cellulaire, tels ceux induits par les $IFN\alpha/\beta$ (David et al., 1995) et γ (Blanchette et al., 1999; Massa et Wu, 1996). De même, elle pourrait inhiber la phagocytose en déphosphorylant directement le récepteur Fc γ RIIA et la PTK Syk ou en se liant au récepteur inhibiteur Fc γ RIIB responsable lui aussi de l'inhibition de Fc γ RIIA (Huang et al., 2003). Elle serait également impliquée dans l'inactivation d'autres kinases faisant partie de cette voie dont CBL, PI3K et la petite protéine G Rac (Kant et al., 2002).

La SHP-1 est impliquée dans la régulation négative de la migration et l'adhésion cellulaires par son interaction avec diverses molécules reliées à la signalisation découlant de l'attachement des intégrines. Entre autres, la SHP-1 se lie à la paxilline, la vimentine et l'actine (Yeung et al., 1998). Par ailleurs, elle régule négativement la PI3K (Cuevas et al.,

1999; Roach et al., 1998) qui est activée suite à l'attachement des intégrines et qui régule le réarrangement du cytosquelette et l'adhésion cellulaire (Shimizu et Hunt, 1996).

Finalement, la majorité des effets de la SHP-1, mentionnés ci-haut, sont dus à l'inhibition de plusieurs kinases et voies de signalisation.

Outre celles déjà nommées, notons le rôle primordial de la SHP-1 dans l'inactivation des voies JAK/STAT après stimulation des récepteurs de cytokines. En effet, il a été rapporté la déphosphorylation de JAK1, JAK2, TYK2, STAT1 α , 2, 3, 5a/b et 6 induite par la SHP-1 (David et al., 1995 ; Haque et al., 1998; Klingmüller et al., 1995; Ram et Waxman, 1997; Yeung et al., 1998). De plus, les souris *mev* avaient une activité accrue du facteur de transcription NF- κ B (Khaled et al., 1998 ; Massa et Wu, 1998) qui provoquait une exacerbation de la réponse inflammatoire. SHP-1 pourrait aussi activer (Krautwald et al., 1996 ; Xie et al., 2000) et inhiber (Nandan et al., 1999) les MAPKs. Pour ce qui est des rôles activateurs joués par la SHP-1, il semble qu'en plus des MAPKs, elle puisse induire l'activation de la PTK Src (Somani et al., 1997).

d. Mutations de SHP1 et pigmentation

De manière intéressante, les souris *motheaten* sont caractérisées par la présence de plaques cutanées dépourvues de pigmentation. Il existe extrêmement peu de données relatives à l'expression et la fonction de SHP1 dans les mélanocytes. Cependant, il a été montré que SHP1 était exprimée dans des cellules PC12, une lignée cellulaire du phéochromocytome chez le rat, dérivées de la crête neurale.

Dans une étude publiée en 1996, les auteurs se sont intéressés à la régulation négative du récepteur RTK C-KIT par SHP1 *in vivo*. Ils ont effectué une analyse génétique de l'interaction entre c-Kit codé au locus *W* et SHP1 codé au locus *motheaten* (*me*). À cette fin, les souris porteuses d'un allèle de c-Kit défectueux (*W^v/+*) ont été croisées avec des

souris *me/+*, qui portent un allèle de SHP1 nul, puis recroisées pour générer toutes les combinaisons alléliques possibles. Les résultats indiquent une forte complémentarité intergénique entre ces *loci* dans les cellules progénitrices hématopoïétiques. Comparativement aux progéniteurs purifiés à partir de souris normales, les cellules progénitrices de la moelle osseuse de souris *me/me* ont fortement proliféré en réponse au ligand Kit (KL). La superposition du génotype *me/me* a augmenté le nombre de cellules dérivées de la moelle osseuse chez les souris *W^v/+*. Inversement, la présence d'une ou deux copies de *W^v* a réduit le nombre de macrophages et de granulocytes dans le poumon, la peau, le sang périphérique et la moelle osseuse, diminuant ainsi la gravité du phénotype *me/me*. La diminution des mastocytes cutanés, chez les souris *W^v/W^v*, a été restaurée à des niveaux trouvés chez les souris *W^v/+* par superposition du génotype *me/me*.

Le récepteur c-kit est impliqué dans la prolifération, la survie, la migration et la différenciation des cellules de la crête neural dont sont issus les mélanocytes. Dans le mélanocyte adulte, l'activation de c-kit conduit notamment à l'activation de la voie de MAPK qui phosphoryle MITF augmentant ainsi la transcription des enzymes de la mélanogénèse.

Dans cette étude, *W^v* réduit la gravité du phénotype *me/me*, mais *me/me* ne modifie pas l'effet de *W^v* sur le développement des mélanocytes. La présence ou l'absence de l'allèle *me* n'a eu aucune conséquence évidente sur les effets du *locus* c-kit sur le phénotype de couleur du pelage (Lorenz U. et al., 1996). Conformément à l'absence d'interaction génétique entre *me* et *W^v* pour la détermination de la couleur du pelage, l'expression de la protéine SHP1 analysée en Western Blot n'a pas été observée dans les mélanocytes primaires. (Figure 34)

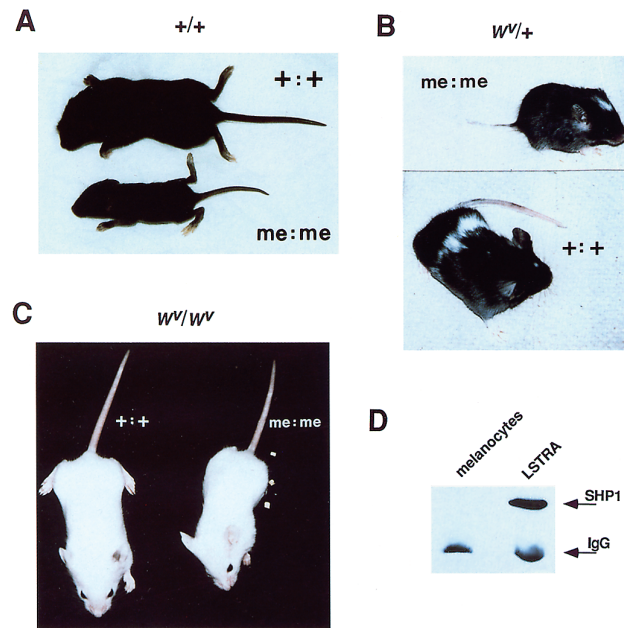


Figure 34 A-C La présence ou l'absence de l'allèle *me* n'a pas de conséquence évidente sur les effets du locus *c-kit* sur le phénotype de couleur du pelage. D Comparaison de l'expression de SHP1 dans des mélanocytes primaires en culture et des cellules LSTRA qui expriment une grande quantité de SHP1. (D'après Lorenz U. et al., 1996)

Ces résultats suggèrent que le SHP1 ne serait pas un régulateur négatif de *c-Kit* dans les mélanocytes ni dans les cellules de la crête neurale moins différenciées.

2. La tyrosine phosphatase SHP2

a. Structure, modes de reconnaissance et d'activation

La tyrosine phosphatase SHP2 (*SH2 containing phosphatase 2*) est codée par le gène *PTPN11* localisé sur le chromosome 12 (12q24.13). Elle partage 60% d'identité de séquence avec SHP-1. (Figure 35)

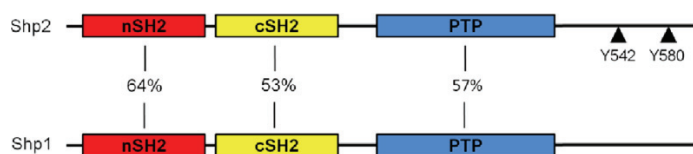


Figure 35 Les phosphatases SHP1 et SHP2 partagent 60% d'identité de séquence.

Elle contient, elle aussi, 2 domaines SH2 (N-SH2 et C-SH2) dans sa portion N-terminale, un domaine phosphatase (PTP) conservé en position centrale et une queue C-terminale qui comprend les résidus tyrosines Y⁵⁴² et Y⁵⁸⁰ qui peuvent être phosphorylés (Adachi et al., 1992).

Initialement, il a été suggéré que les 2 résidus tyrosines Y⁵⁴² et Y⁵⁸⁰ phosphorylés intervenaient directement dans l'activation de SHP-2 par leur interaction avec les domaines N-SH2 et C-SH2, permettant ainsi de passer de la conformation fermée/inactive à ouverte/active (Bennett *et al.*, 1994). Ce sont des expériences *in vitro* avec stimulation de SHP-2, muté ou non sur son site catalytique PTP, par le biais de l'insuline et de son récepteur (IGFR), qui ont révélé que son activation s'accompagnait initialement de la phosphorylation de ses résidus tyrosine, mais seulement de façon très brève et transitoire. La mutation de son site catalytique permet de maintenir et prolonger son niveau de phosphorylation après activation. La tyrosine phosphatase SHP-2 est donc capable de moduler, elle-même, son niveau de phosphorylation et donc d'activation en s'auto-déphosphorylant (mécanisme d'auto-inhibition) (Stein-Gerlach et al., 1995).

Les domaines SH2 de la SHP-2 jouent les mêmes rôles de reconnaissance des substrats et d'autorégulation de l'activité de la PTP que SHP1 (Tonks et Neel, 2001).

(Figure 33)

Les deux phosphatases ont plusieurs substrats en commun, notamment : le récepteur inhibiteur SHPS-1, les récepteurs de l'IL-3, de l'érythropoïétine, des différents CSF, c-kit, ainsi que la protéine adaptatrice Grb2 et la PI3K (Mustelin et al., 1998).

À l'opposé de SHP-1, SHP-2 a une distribution plus générale dans la majorité des tissus. Il semblerait que ce soit le domaine phosphatase qui déterminerait la spécificité de SHP-2 vs SHP-1, leurs domaines SH2 étant, la plupart du temps, interchangeables (Tonks et Neel, 2001).

b. Substrats et rôle dans la signalisation cellulaire

SHP2 est recrutée en réponse à de nombreuses hormones, cytokines ou facteurs de croissance. Elle a été montrée pour être impliquée dans plusieurs voies de signalisation faisant intervenir des événements de phosphorylation sur tyrosine, comme les voies RAS/MAPK, PI3K/AKT ou JAK/STAT (Noguchi et al., 1994 ; You et al., 1999 ; Zhang et al., 2002 ; Chen et al., 2003 ; Neel et al., 2003 ; Edouard et al., 2010).

À la différence des PTPs classiques (notamment SHP1) qui sont généralement vues comme des régulateurs négatifs du signal, SHP2, à l'exception de quelques cas, joue un rôle positif dans la signalisation cellulaire.

- **Rôle de SHP2 dans la voie MAPK**

La fonction la mieux établie de SHP2 est d'activer la voie RAS/MAPK en réponse à de nombreux agonistes. En effet, en aval de plusieurs RTK, SHP2 est nécessaire pour maintenir l'activation des MAPK et, dans certains cas, leur activation est même inexistante en l'absence de SHP2 (Noguchi et al., 1994 ; Neel et al., 2003; Dance *et al.*, 2008). Le rôle de SHP2 dans l'activation des MAPK est si important que des mutations activatrices de SHP2 induisent une hyperactivation de la voie RAS/MAPK et sont à l'origine de nombreuses pathologies. Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette activation sont encore mal compris et plusieurs hypothèses ont été émises.

La première hypothèse suggérerait que SHP2 serait, via ses résidus Y⁵⁴² et Y⁵⁸⁰ phosphorylés, une protéine adaptatrice pour le complexe GRB2/SOS permettant son recrutement en réponse à plusieurs agonistes, en particulier le PDGF (Bennett et al., 1994; Vogel and Ullrich, 1996). Ainsi, le recrutement de SHP2 au récepteur du PDGF permettrait le recrutement du complexe GRB2/SOS et induirait ainsi l'activation de RAS. Cependant, cette hypothèse est controversée puisque SHP2 n'est pas phosphorylée en réponse à l'EGF

ou l'IGF1. L'effet promoteur de SHP2 sur la voie RAS/MAPK serait probablement indépendant de sa fonction adaptatrice (Araki *et al.*, 2003).

D'autres hypothèses ont été émises et impliquent l'activité catalytique de SHP2 dans la régulation de la voie RAS/MAPK. En effet, plusieurs études montrent que l'expression de mutants catalytiquement inactifs de SHP2 supprime l'effet promoteur de la phosphatase sur la voie RAS/MAPK induite par plusieurs facteurs de croissances et cytokines (Noguchi *et al.*, 1994 ; Deb *et al.*, 1998 ; Maroun *et al.*, 2000).

Plusieurs protéines ont été impliquées dans cette régulation, notamment :

SPROUTY

Cette protéine est bien connue pour inhiber la voie RAS/MAPK en réponse à plusieurs facteurs de croissance (Masoumi-Moghaddam *et al.*, 2014). Ainsi, en réponse à divers facteurs de croissance, la phosphorylation de SPROUTY entrainerait sa liaison à GRB2, empêchant ainsi l'interaction du complexe GRB2/SOS nécessaire à l'activation de RAS (Hanafusa *et al.*, 2002). De façon intéressante, SHP2 a été montrée pour déphosphoryler SPROUTY à la fois *in vitro* et *in vivo* entraînant ainsi la levée d'inhibition de SPROUTY sur l'interaction entre GRB2 et SOS et sur l'activation des MAPK (Hanafusa *et al.*, 2004).

RASGAP

RAS est négativement régulée par des GAPs dont fait partie p120-RASGAP. Il a été montré que SHP2 favorisait l'activation de RAS en déphosphorylant les sites de recrutement de RASGAP au niveau du récepteur à l'EGF, excluant ainsi RASGAP du complexe de signalisation (Cleghon *et al.*, 1998; Agazie and Hayman, 2003). De plus, il a également été montré que SHP2 déphosphoryle les sites de recrutement de RASGAP au niveau de la protéine adaptatrice GAB1 (GRB2-associated binder-1) en réponse à l'EGF ou à l'hormone de croissance (Montagner *et al.*, 2005; Bard-Chapeau *et al.*, 2006; Serra-

Nedelec *et al.*, 2012). Ainsi, que ce soit par l'intermédiaire d'un récepteur ou de protéines adaptatrices, SHP2 stimule l'activation de RAS en excluant la protéine inhibitrice RASGAP du complexe de signalisation.

RAS

Des travaux récents ont identifié que RAS elle-même pouvait être phosphorylée sur sa tyrosine Y³² par les kinases SRC, et que cette phosphorylation favorise son interaction avec RASGAP, promouvant ainsi son retour à l'état GDP lié, et empêche son interaction avec RAF. Or cette étude montre aussi que SHP2 déphosphoryle spécifiquement ce résidu, maintenant RAS dans son état activé et permettant son action activatrice sur RAF (Bunda *et al.*, 2015).

SRC kinases

Ces protéines cytosoliques sont impliquées dans la signalisation de nombreux RTKs pouvant réguler la voie RAS/MAPK (Bromann *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009). SHP2 semblerait agir en amont des SRC pour promouvoir l'activation des MAPK (Yang *et al.*, 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour savoir comment SHP2 active SRC. En effet, SRC est inhibée par phosphorylation sur sa tyrosine Y⁵²⁷ par la kinase CSK (C-terminal SRC Kinase), elle-même recrutée via les protéines adaptatrices Paxilline et Cbp/PAG. Il a été montré qu'en réponse à l'EGF, le recrutement de SHP2 sur GAB1 conduit à la déphosphorylation de la Paxilline sur ces sites de recrutement pour CSK, qui est alors exclue du complexe de signalisation et lève son effet inhibiteur sur SRC. Ainsi, SRC reste activée et continue de promouvoir l'activation de RAS/MAPK (Ren *et al.*, 2004). Un autre mécanisme proposé serait que SHP2 induirait une déphosphorylation de Cbp/PAG diminuant l'accès de CSK au complexe de signalisation et donc à SRC. De manière générale, SHP2 favoriserait donc l'activation de SRC en déphosphorylant les sites de recrutement

de son inhibiteur CSK (Zhang et al., 2004). SHP2 active la voie RAS/MAPK en déphosphorylant des inhibiteurs de la voie comme SPROUTY, P120- RASGAP, CSK.

- **Rôle de SHP2 dans la voie PI3K**

SHP2 régule l'activation de la voie PI3K mais son rôle est encore mal compris et a l'air dépendant de l'agoniste utilisé. En effet, il a été montré que dans un même type cellulaire, SHP2 inhibe l'activation d'AKT en réponse à l'EGF alors qu'elle stimule son activation en réponse au PDGF ou à l'IGF-1 (Zhang et al., 2002). D'un point de vue mécanistique, l'effet de SHP2 sur l'activation d'AKT en réponse à l'EGF serait dû aux déphosphorylations des sites de recrutement de la sous-unité p85 sur la protéine adaptatrice GAB1, diminuant le recrutement de la PI3K (Zhang et al., 2002 ; Edouard et al., 2010).

En réponse à l'insuline, plusieurs études montrent que SHP2 s'associe au récepteur de l'insuline (Rocchi et al., 1996) mais également au niveau de protéines adaptatrices comme IRS-1 (Case et al., 1994; Myers et al., 1998). IRS-1 possède des résidus tyrosines (1172 et 1222) pouvant servir de point d'ancrage à SHP2 via ses domaines SH2 (Case et al., 1994). Cependant, l'effet de SHP2 sur la voie PI3K est encore controversé. En effet, certains auteurs émettent l'hypothèse que SHP2 améliorerait la signalisation PI3K/AKT sous insuline (Ugi et al., 1996). Dans cette étude, l'expression d'un mutant de SHP2 délété de son domaine phosphatase, dans des fibroblastes de rat surexprimant le récepteur humain de l'insuline, diminue l'activité de la PI3K sous stimulation par l'insuline. Cet effet est corrélé à une diminution de la phosphorylation de IRS-1 suggérant que SHP2 potentialise par un mécanisme indirect la phosphorylation de IRS-1 et exerce un effet stimulateur sur l'activation de PI3K. Cependant d'autres auteurs attribuent à SHP2 un rôle négatif dans la voie PI3K/AKT. En effet, l'expression d'une forme mutée de IRS-1 sur les sites d'ancrage de SHP2 (avec deux résidus phénylalanines à la place de résidus tyrosines) empêche le recrutement de SHP2 sur IRS-1, induisant ainsi une hyperphosphorylation globale de IRS-

1 et une activation augmentée de PI3K dans des cellules 32D (Myers et al., 1998). Ceci suggère que SHP2 est recrutée au niveau de IRS-1 et déphosphoryle certains résidus tyrosines empêchant le recrutement de la PI3K et son activation. De plus, dans des 3T3-L1, la surexpression d'un mutant de SHP2 catalytiquement inactif augmente la phosphorylation de IRS-1 et le recrutement de la PI3K sous stimulation par l'insuline, alors que la surexpression d'une forme sauvage de SHP2 a l'effet inverse (Ouwens et al., 2001).

- **Rôle de SHP2 dans la voie JAK/STAT**

De nombreuses études font état d'un lien entre SHP2 et la voie JAK/STAT. En effet, il a été montré que SHP2 régule négativement la voie JAK/STAT1 sous stimulation par de l'IFN γ ou IFN α dans des fibroblastes murins (You *et al.*, 1999). Plus spécifiquement, la phosphorylation Y⁷⁰¹ de STAT1 est prolongée dans des cellules délétées de SHP2 sous stimulation par de l'IFN γ (Wu et al., 2002). Un mutant catalytiquement actif de SHP2 a été montré pour déphosphoryler STAT3 au niveau de la tyrosine Y⁷⁰⁵ sous stimulation par l'EGF ou le GM-CSF (Zhang et al., 2009). De plus, le KO neuronal de SHP2 provoque une hyperactivation de la voie JAK2/STAT3 (Zhang et al., 2004). STAT5 a également été identifiée comme un substrat direct de SHP2 (Chen et al., 2003).

Ainsi, SHP2 joue un rôle dans la régulation de nombreuses voies de signalisation canoniques impliquées dans d'importants processus biologiques comme : le développement, l'inflammation ou le métabolisme. Sa dérégulation, positive ou négative, a des conséquences physiopathologiques importantes. Des mutations perte et gain de fonction de *PTPN11* ont été identifiées dans plusieurs maladies génétiques notamment la métachondromatose (MC, OMIM#156250), le syndrome de Noonan (SN, OMIM#163950), le syndrome LEOPARD (Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples SN-LM, OMIM

#151100). Ces syndromes font partie d'une famille de maladies rares appelées : RASopathies, dont les mutations concernent essentiellement des composants de la voie RAS/MAPK (Paccoud *et al.*, 2018).

c. Pathogenèse du syndrome LEOPARD

Nous nous intéresserons, plus particulièrement, à la pathogenèse du syndrome LEOPARD car il est lié à des mutations de SHP2 qui sont à l'origine d'anomalies pigmentaires (lentigines et taches café au lait).

- **Mutations à l'origine du SL**

Le SL est lié, majoritairement, à des mutations ponctuelles du gène *PTPN11* qui sont retrouvées chez 90% des patients (Digilio *et al.*, 2002; Legius, 2002). Ces mutations sont toutes localisées au niveau du domaine catalytique de SHP2 (Keren, 2004 ; Sarkozy, 2004 ; Sarkozy *et al.*, 2008) et entraînent une perte de son activité.

Le SL est également causé par des mutations sur les gènes *RAF1* et *BRAF*, deux gènes codant pour des protéines intervenant dans la voie RAS/MAPK (Pandit *et al.*, 2007; Koudova *et al.*, 2009; Sarkozy *et al.*, 2009). Ces mutations sont retrouvées dans moins de 5% des patients SN-LM, suggérant que la liste des gènes impliqués dans le SL pourrait s'agrandir.

Les mutations de SHP2 associées au SL sont localisées dans le domaine catalytique sur des résidus conservés qui sont nécessaires pour l'activité PTP comme : le résidu Y²⁷⁹ qui définit la spécificité du substrat et le résidu T⁴⁶⁸ intervenant dans le motif signature (Sarkozy *et al.*, 2008 ; Lauriol et Kontaridis, 2011).

Ainsi, il a clairement été montré que les mutations de SHP2 dans le SL induisent un effondrement de son activité phosphatase, que ce soit à l'état basal ou sous stimulation

par divers phospho-peptides ou agonistes (Hanna *et al.*, 2006 ; Kontaridis *et al.*, 2006 ; Tartaglia *et al.*, 2006; Martinelli *et al.*, 2008; Edouard *et al.*, 2010; Marin *et al.*, 2011).

En effet, Yu *et al.*, ont montré que la constante catalytique d'hydrolyse d'un substrat (pNPP) par les domaines catalytiques des mutants Y279C et T468M était respectivement 26 et 46 fois plus faible que celle du domaine catalytique sauvage (Yu *et al.*, 2013).

De plus, la modélisation structurale des mutants Y279C et T468M de SHP2 associés au SL montre que ces mutations favorisent la conformation ouverte de la phosphatase et son association avec ses partenaires en déstabilisant l'interaction entre le domaine PTP et le domaine N-SH2 (Kontaridis *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2013 ; Qiu *et al.*, 2014). Cette capacité accrue des mutants SN-LM à adopter une conformation ouverte suggère qu'ils pourraient interagir préférentiellement avec leurs activateurs, exerçant ainsi un effet dominant négatif sur la forme WT de SHP2. En effet, il a été décrit que ces mutants présentent une plus grande affinité de liaison à des phospho-peptides comparativement à la forme sauvage de SHP2 (Martinelli *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que les mutants Y279C et T468M s'associent plus précocement, plus fort, et plus longtemps que la forme sauvage de SHP2, à la protéine adaptatrice GAB1, sous stimulation par l'EGF (Kontaridis *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2013). Enfin, une autre étude révèle une liaison soutenue du mutant Y279C de SHP2 à la protéine adaptatrice IRS-1 à l'état basal et sous stimulation par l'IGF-1 (Marin *et al.*, 2011).

Ainsi, les mutations SN-LM de SHP2 induisent une profonde altération de son activité catalytique et une destabilisation de sa structure favorisant une conformation ouverte de la protéine. Ceci conduirait la forme de SHP2 associée au SL à exercer un effet dominant négatif sur la forme sauvage en se fixant préférentiellement aux protéines adaptatrices.

- **Impact des mutations associées au SL sur les voies de signalisation**

L'impact des mutations SL de SHP2 sur la signalisation a été étudié au niveau des voies RAS/MAPK et PI3K.

Il a été rapporté que l'expression de mutants de SHP2 associés au SL (Y279C, T468M et A461T), dans des HEK (cellules rénales embryonnaires humaines) ou dans des embryons de poisson-zèbre, provoque une hypo-activation (baisse de la phosphorylation) de ERK1/2 en réponse à divers facteurs de croissance comme : l'EGF, le FGF ou le PDGF (Kontaridis *et al.*, 2006 ; Stewart *et al.*, 2010). De plus, dans le premier modèle murin de SL portant à l'état hétérozygote la mutation Y279C, Marin *et al.*, ont également observé une baisse de la phosphorylation de ERK1/2 dans le cœur en réponse à plusieurs agonistes (Marin *et al.*, 2011). Mécanistiquement, cette baisse de la phosphorylation résulterait du recrutement préférentiel de la forme mutée de SHP2 à celle sauvage, diminuant ainsi l'activation de la voie RAS/MAPK (Kontaridis *et al.*, 2006 ; Qiu *et al.*, 2014).

Concernant la voie PI3K, il a été montré, aussi bien dans des cellules transfectées que dans des fibroblastes de patients ou encore au niveau de cardiomyocytes de rat, que les mutants SL induisent une hyperactivation de la voie PI3K en réponse à l'EGF. Cette dernière se traduit par une hyperactivation d'AKT et de ses cibles en aval comme : GSK3 β , mTOR, RPS6KB1/p70S6K ou Ribosomal S6 protein (Edouard *et al.*, 2010 ; Ishida *et al.*, 2011; Schramm *et al.*, 2012, 2013). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* où une hyperactivation d'AKT ou de ses cibles a été mesurée dans des cœurs de poisson zèbre SL ainsi que dans des cœurs hypertrophiques de modèle murins SL (Marin *et al.*, 2011 ; Schramm *et al.*, 2012).

- **Impact des mutations associées au SL sur la pigmentation**

Une équipe s'est récemment intéressée, plus particulièrement, à la compréhension du mécanisme par lequel les mutations perte de fonction de SHP2 sont à l'origine des lentigines. (Motegi S. *et al.*, 2015) Ils ont comparé, en microscopie électronique, l'ultrastructure de peau hyperpigmentée (lentigine) et normale de 2 patients porteurs des mutations Y279C et T468M sur le gène *PTPN11*. De plus nombreux mélanosomes matures (stade III et IV) et de plus grande taille (250-450nm) ont été observés dans les mélanocytes présents dans les lentigines par rapport à la peau normale. Les kératinocytes des lésions hyperpigmentées contiennent également de plus nombreux mélanosomes dont le diamètre est aussi plus élevé (450-500nm). L'analyse immunohistochimique des lentigines a montré une augmentation significative de l'expression de ET-1 mais pas de différence d'expression de l' α MSH et de SCF. Cependant, Kadono *et al.* ont rapporté que l'expression de ET-1 était augmentée dans l'épiderme de lentigo chez des patients sains, suggérant que l'augmentation de l'expression de ET-1 observée dans les lentigines de patients SL n'est pas spécifique au SL. De plus, il n'y a pas d'augmentation d'expression d'ET-1 dans les kératinocytes des peaux saines de patients SL qui portent la mutation. L'ensemble de ces données suggère que les mélanocytes et/ou les kératinocytes porteurs de la mutation de SHP2 associée au SL pourraient sécréter des cytokines ou facteurs de croissance qui entraînent l'augmentation de la sécrétion d'ET-1 par les kératinocytes et le développement des lentigines.

De façon intéressante, les auteurs montrent une augmentation des formes phosphorylées d'AKT, mTOR et STAT3 dans les lentigines. L'augmentation d'activité des mélanosomes serait ainsi liée à l'hyperactivation de la voie PI3K/AKT. Ils ont également étudié l'effet de la mutation de SHP2 sur la synthèse de mélanine *in vitro* dans des cellules de mélanome humain G-361. La surexpression des formes mutées de SHP2 (T468P ou

Y279C), dans les cellules G-361, entraîne une augmentation significative de la quantité de mélanine par rapport à la surexpression de la forme sauvage. L'ajout d'un inhibiteur de mTOR, la rapamycine, empêche l'augmentation de la synthèse de mélanine dans les cellules SHP2 mutantes. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie mTOR, dans les mélanocytes surexprimant SHP2 portant les mutations associées au SL, pourrait être impliquée dans la stimulation de la synthèse de mélanine. Les auteurs proposent une représentation schématique du rôle des mutations de SHP2 associées au SL dans la synthèse de mélanine. (Figure 36)

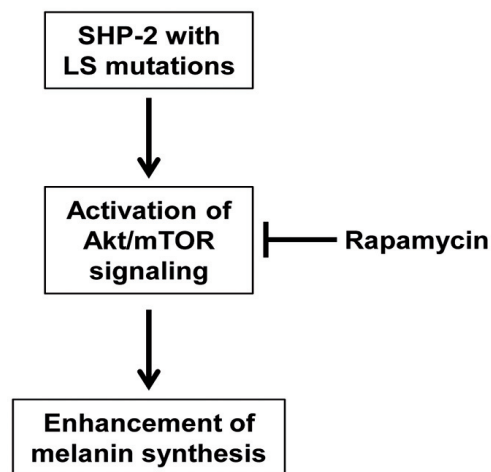


Figure 36 Représentation schématique du rôle des mutations de SHP2 associées au SL dans la synthèse de mélanine.

(D'après Motegi et al., 2015)

Bien que la physiopathologie de la surdité n'ait jamais été explorée, il est intéressant de noter qu'une population de mélanocytes participe au fonctionnement de l'oreille interne et qu'une corrélation existe entre anomalies de la pigmentation et surdité. Un mécanisme commun pourrait donc être impliqué dans ces deux symptômes.

II. Présentation du projet de thèse

A. Contexte général et hypothèse de travail

L'acquisition d'une pigmentation, suffisante et homogène, est un processus complexe qui n'est possible que si l'ensemble des éléments impliqués, dans sa mise en place et sa régulation, est fonctionnel. Les troubles pigmentaires font partie des affections cutanées les plus fréquentes dans le monde. Dans certains pays, leur prévalence peut atteindre 60%. Il est désormais reconnu que ces troubles ont un impact négatif important sur la qualité de vie des personnes qui les développent. Souvent stigmatisés, dans leurs vies personnelles ou professionnelles, les patients peuvent souffrir d'anxiété et de dépression, les conduisant à l'isolement social. La demande thérapeutique est donc forte mais les solutions actuelles restent limitées. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques capables de moduler la pigmentation apparaît donc indispensable.

Dans ce contexte, une étude transcriptomique à large échelle a été réalisée sur des peaux lésionnelles de patients atteints de vitiligo (dépourvues de mélanocytes et donc de pigmentation) comparées à des peaux non lésionnelles et des peaux de sujets sains. L'analyse différentielle des transcrits a permis la découverte d'un nouveau gène dont l'expression est significativement régulée négativement dans les peaux lésionnelles en comparaison avec les peaux non lésionnelles ou saines : CLEC12B. Le degré de régulation de CLEC12B étant similaire à ceux observés pour les enzymes clés de la mélanogenèse comme TYR, TYRP1 ou DCT, nous avons émis l'hypothèse que CLEC12B pourrait être un gène mélanocytaire important et jouer un rôle, jusqu'ici inconnu, dans la pigmentation cutanée.

CLEC12B est membre de la famille des lectines de type C, qui sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine ITIM capable de recruter et d'activer des phosphatases. A ce jour, très peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce gène qui a uniquement été rapporté dans les cellules myéloïdes. Son ligand ainsi que les voies de signalisations en aval n'ont toujours pas été identifiés et aucun lien n'a été rapporté entre CLEC12B et la pigmentation cutanée.

B. Objectifs

L'objectif général de ce travail de recherche a été de déterminer le rôle de CLEC12B dans la fonction mélanocytaire et, plus particulièrement, dans le processus de la mélanogenèse. Ce nouvel apport dans la compréhension de la physiologie de la pigmentation cutanée pourrait permettre, *in fine*, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'aboutir un jour au développement d'agents dans le traitement clinique des troubles pigmentaires.

Plus concrètement, plusieurs interrogations concernant le rôle de CLEC12B dans la pigmentation cutanée ont été soulevées au cours de cette étude et ont ainsi fait l'objet de mon travail de thèse :

1. CLEC12B est-il exprimé dans les mélanocytes humains normaux et dans les peaux saines ?
2. CLEC12B est-il différentiellement exprimé selon le phototype de peau ?
3. La modulation de l'expression de CLEC12B affecte-t-elle la mélanogenèse dans les mélanocytes humains en culture et la pigmentation dans un modèle d'épiderme reconstruit ?
4. Quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation de la mélanogenèse par CLEC12B ?

III. RESULTATS

Premier article (en révisions dans Journal of Clinical Investigation)

CLEC12B: a new gene regulating the color of skin

***CLEC12B*: A new gene regulating the color of the skin**

Laura SORMANI LE BOURHIS¹, Hélène TAQUIN MARTIN², Rana MHAIDLY¹, Els VERHOEYEN^{1,3}, Claire REGAZZETTI¹, Marjorie HEIM¹, Nicolas NOTTET¹, Meri K TULIC¹, Yann CHELI¹, Gian Marco DE DONATIS¹, Anne Sophie DABERT GAY⁴, Delphine DEBAYLE⁴, Nathalie CARDOT LECCIA⁵, Franck GESBERT⁶, Henri MONTAUDIE^{1,2}, Stéphane ROCCHI¹ and Thierry PASSERON^{1,2}

¹ Université Côte d'Azur. Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M). INSERM U1065 – Nice – France

² Université Côte d'Azur. Centre hospitalier universitaire Nice. Department of Dermatology. Nice, France

³ CIRI, Université de Lyon; INSERM U1111; ENS de Lyon; Université Lyon1 ; CNRS, UMR 5308, 69007 Lyon, France

⁴ Université Côte d'Azur. Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire (IPMC) CNRS, CAPABIO Platform, Sophia Antipolis, France.

⁵ Université Côte d'Azur. Centre hospitalier universitaire Nice. Department of Pathology. Nice, France

⁶ University Paris-Sud, University Paris-Saclay. Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1021, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France. CNRS, UMR 3347, Orsay, France. Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Orsay, France

Correspondence:

Pr. Thierry Passeron, MD, PhD
Department of Dermatology and C3M INSERM U1065
151 route Saint-Antoine de Ginestière
06200 Nice, France
Email: passeron@unice.fr

Manuscript word count: 4000

Figures: 4

Tables: 0

Keywords: Skin pigmentation; *CLEC12B*; melanogenesis; SHP-1; SHP-2.

ABSTRACT

Transcriptome analysis of pigmented skin compared to skin devoid of melanocytes, allowed us to identify *CLEC12B* as a new melanocytic gene. We demonstrated that CLEC12B is selectively expressed in melanocytes, and that its expression is decreased in highly pigmented skin compared to white skin. CLEC12B directly recruits and activates SHP-1 and SHP-2 through its ITIM domain and promotes CREB degradation, leading to downregulation of the downstream MITF pathway. CLEC12B ultimately controls melanin production and pigmentation *in vitro* and in a model of reconstructed human epidermis. The identification of CLEC12B unveils a new therapeutic target for the development of melanogenic agents in the clinical and cosmetic fields, but it also provides novel insights in the understanding of the melanocyte biology and regulation of melanogenesis.

INTRODUCTION

The pigmentation of the skin is a very complex and tightly regulated process. The melanocytes synthesize melanins, the main pigments of the skin, within specific organelles called melanosomes, that are further transported and transferred to the surrounding keratinocytes for protecting them from the harmful effects of ultraviolet radiations(1). Among all the pathways involved in the pigmentation process, the melanocortin 1 receptor (MC1R) / cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway is the most critical one. Upon the stimulation of the MC1R receptor at the surface of melanocytes, the cAMP activates melanocyte inducing transcription factor (MITF) through the c-AMP response element-binding protein (CREB)(2, 3). MITF is the key transcription factor of pigmentation, as it directly regulates the production of the melanocytic enzymes, tyrosinase and dopachrome tautomerase (DCT)(4). However, beside MC1R, other pathways can modulate MITF expression and impact melanogenesis. A better understanding of the factors involved in the regulation of this pathway, is critical to understand the melanogenic process and to find new therapeutic targets for treating pigmentary disorders.

We recently performed a transcriptome analysis of the lesional and non lesional skin of vitiligo patients and compared them to the skin of healthy volunteers(5). By performing further in-depth analysis of non-lesional vitiligo skin and healthy skin compared to lesional vitiligo skin (that are devoid of melanocytes), we segregated the key melanocytic genes. Among the top melanocytic genes, we isolated the C-Type Lectin Domain Family 12 Member B (*CLECI2B*). C-type lectin receptors (CLRs) are soluble and transmembrane proteins that are usually involved in the recognition of self-antigens and pathogens(6). Most of the CLRs to date have been described in immune cells. However, some are also expressed by other tissues including the brain, liver and the kidneys(7). In the skin, keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells express several CLRs(8, 9). In humans, CLRs are known to be involved in inflammation and

immune response(10, 11). CLEC12B contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its intracellular domain. CLEC12B has been reported to be expressed on myeloid cells and to recruit phosphatases SHP-1 and SHP-2(12). Here, we show that CLEC12B is selectively expressed by melanocytes in the skin. CLEC12B expression is higher in fair skin compared to highly pigmented skin. CLEC12B recruits and activates SHP-1 and SHP-2 that induces the proteosomal degradation of CREB, and downstream to the decrease of MITF and the melanocytic enzymes. Thus, CLEC12B is a new key melanocytic gene, critical in regulation of human skin pigmentation, suggesting that the role of CLRs may extend beyond inflammation and immunity.

RESULTS AND DISCUSSION

Making use of previously generated transcriptomic data(5), we compared non-lesional vitiligo skin and healthy skin to lesional vitiligo skin to segregate the key melanocytic genes. Among all the top melanocytic genes, we found CLEC12B to be highly expressed in healthy subjects (Figure 1a) and in the non lesional skin of vitiligo patients (Figure 1b), compared to lesional vitiligo skin. The decreased expression of CLEC12B in lesional vitiligo skin which did not contain melanocytes is comparable to the degree of decrease observed in known key melanocytic genes such as DCT, MLANA, TYRP1, TRPM1 or TYR (Figures 1a and 1b, right panels) suggesting that CLEC12B could be an important melanocytic gene. To confirm this hypothesis, an immunofluorescence staining of CLEC12B and MITF was performed on normal human skin samples. This staining reveals co-expression of CLEC12B and MITF in melanocytes (Figure 1c). The comparative analysis of the expression level of CLEC12B mRNA in the 3 main cell types of human skin (keratinocytes, fibroblasts and melanocytes) using qPCR showed that there is 5 times more CLEC12B mRNA expressed in human melanocytes

compared to keratinocytes and 15 times more when compared to human fibroblasts (Figure 1d). Protein sequence data show that CLEC12B possess a hydrophobic transmembrane domain suggesting a localization of the receptor at the cell surface. However, immunofluorescent staining of endogenous CLEC12B in normal human melanocytes showed a diffuse cytoplasmic subcellular distribution (Supplementary Figure 1a). To verify that the observed cytoplasmic staining of CLEC12B with anti-CLEC12B antibody is specific, we used lentiviral-mediated overexpression of recombinant CLEC12B fused with a GFP. We observed a colocalization between anti-CLEC12B and anti-GFP antibodies, validating the specificity of CLEC12B antibody (Supplementary Figure 1b). This GFP-fusion CLEC12B allowed us to confirm a cytoplasmic distribution of CLEC12B, but also showed CLEC12B to be expressed at the cell surface of some melanocytes (Supplemental Figure 1c). We further analyzed the expression of CLEC12B accordingly to the skin phototype. CLEC12B mRNA expression level in melanocytes extracted from fair-skin patients (skin type I/II) is significantly higher compared to CLEC12B mRNA expression in melanocytes extracted from dark-skin patients (phototypes V/VI) (Figure 1e). Then, using immunohistochemistry, we stained for CLEC12B in fair skin (phototype I/II) and in dark skins (phototypes V/VI). Interestingly, a strong expression of the protein was observed in melanocytes obtained from the fair skinned individuals, but the CLEC12B staining was much weaker in dark skins (Figure 1f). Taken together, these data show that CLEC12B is a specific melanocyte protein and that its expression is higher in fair skin individuals compared to dark skin.

To investigate the role of CLEC12B on melanogenesis (the main melanocyte function), we used a lentiviral-mediated silencing of CLEC12B with shRNA (sh-CLEC12B) and a lentiviral mediated overexpression (Ov-CLEC12B). The efficiency of 3 different sequences of shRNA was analyzed by qPCR and the constructs with the best knockdown was used for the study (90% efficiency in gene knockdown with construct #3, Figure 2a left panel and Supplemental Figure

2a). In contrast with qPCR results, we were unable to detect decreased expression of endogenous CLEC12B protein level (Supplemental Figure 2b). This is likely to be due to the relatively low basal expression of CLEC12B in human melanocytes. The construct used to overexpress CLEC12B was also validated by qPCR (Figure 2a right panel). In western blot, the predicted molecular band size of CLEC12B is 32kDa. However, we observed that the overexpressed CLEC12B band appears at ~ 40kDa (Supplemental Figure 2b). We therefore performed a proteomic analysis by mass spectrometry of the band observed between 25 and 35 kDa (which correspond to the expected molecular weight) and the band at ~ 40kDa when we overexpress CLEC12B (Supplemental Figure 2c). The presence of CLEC12B peptide was detected only in the 40kDa band. The CLEC12B protein contains three potential sites for Asn-linked glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr at position 91, 176 and 237) which might increase the total weight of the protein by 2.5 kDa for each additional site. We supposed that CLEC12B is glycosylated when overexpressed, to reach a size of 40kDa. To further assess this hypothesis, we exposed the cells to tunicamycin, an inhibitor of Asn-linked glycosylation. In presence of tunicamycin, the molecular weight of the CLEC12B protein is reduced to 32-35 kDa demonstrating that CLEC12B is glycosylated when overexpressed (Supplemental Figure 2d). Transfected cell pellets (Figure 2b) and live cells observed by contrast phase microscopy (Figure 2c) demonstrate an increased pigmentation in sh-CLEC12B-transduced melanocytes compared to Sh-control (Figures 2b and 2c, left panels) and decreased pigmentation in cells overexpressing CLEC12B compared to control (Figures 2b and 2c, right panels). Similarly, CLEC12B silencing induces a significant increase in melanin content (almost 2 times higher) compared to control ($p=0.0156$). On the contrary, the CLEC12B overexpression reduces melanin content (2 times lower) ($p=0.0312$) (Figure 2d). Melanin production requires the tyrosinase enzyme, which catalyzes multiple reactions in the melanin biosynthetic pathway. Accordingly, we visualized an increase of the tyrosinase activity in the CLEC12B silenced

melanocytes compared to the control (Figure 2e) and this augmentation was quantified, showing significant increase in fluorescent staining in Sh-CLEC12B compared to Sh-control melanocytes ($p < 0.0001$) (Figure 2f). These results show that CLEC12B modulates melanogenesis and has a direct effect on melanocyte tyrosinase activity.

The color of the skin not only reflects the capacity of melanocytes to produce melanin but also their ability to transfer the melanin to the surrounding keratinocytes. To further assess the role of CLEC12B on skin pigmentation, it is important to study melanocytes in their physiological cellular microenvironment. Thus, we used a model of human epidermis reconstruction composed of normal human keratinocytes cultured in presence of normal human melanocytes transduced with lentivirus to silence (Sh-CLEC12B) or to overexpress CLEC12B (Ov-CLEC12B). The variation of pigmentation observed in the skin constructs was photographed (Figure 3a), observed using transmitted light microscope (Figure 3b) and quantified from melanin-stained slides of the skin (Figure 3cd and Supplementary Figure 3a). Melanin content was quantified using a melanin assay. In accordance with observed color of the skin, the melanin content is significantly increased when CLEC12B is silenced and significantly decreased when CLEC12B is overexpressed (Figure 3e). A Fontana Masson staining of melanin pigment was performed to visualize the quantity of pigment present in the reconstructed epidermis but also to examine the distribution of melanin to the adjacent keratinocytes (Figure 3c). In the Sh-CLEC12B condition, melanocytes are more dendritic, and the entire epidermis is more pigmented. On the contrary, decreased melanin content in the epidermis was observed when CLEC12B is overexpressed. These observations were confirmed by semi-quantitation of 30 images *per* condition using ImageJ software (Figure 3d) and by melanin assay (Figure 3e).

To elucidate the mechanisms of CLEC12B-induced melanogenesis, the effects of CLEC12B on the expression of melanin synthesis-related proteins (TYR, DCT and MITF) were analyzed

by western blot. The silencing of CLEC12B markedly increased CREB, P-CREB, MITF, TYR, DCT and TRP1 expression levels (Figure 4a, left panel). On the contrary, CLEC12B overexpression decreased the expression of all of these melanin-synthesis related proteins (Figure 4a, right panel). Western blot analysis of the proteins extracted from the reconstructed epidermis confirmed the modulation of CLEC12B in the models and showed an increased expression of MITF when CLEC12B is silenced, and a decrease in MITF when CLEC12B is overexpressed (Supplemental Figure 3b). CREB is the main regulator of the MITF expression. Interestingly, overexpression of CLEC12B decreases the level of phospho-CREB but also the level of CREB total and the opposite is observed when CLEC12B is silenced (Figure 4a). To determine whether CLEC12B contributes to decreased CREB expression levels through transcription or protein degradation, a RT-qPCR was performed using CREB specific primers. The overexpression of CLEC12B shows no effect on CREB mRNA levels (Supplemental Figure 4). Thus, we investigated whether the downregulation of CREB expression is caused by proteasomal degradation. Normal human melanocytes overexpressing CLEC12B and controls were treated with MG132 (a proteasome inhibitor). MG132 prevents the decreased expression of CREB expression in Ov-CLEC12B condition (Figure 4b). Taken together, these results show that CLEC12B induces the proteasomal degradation of CREB. Sequence data shows that CLEC12B possesses an ITIM domain (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). ITIM bearing receptors recruit tyrosine phosphatases to negatively regulate the activity of downstream signaling pathways(13). In many cases, ITIM-containing CLRs associate with the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 or SHP-2 which can inhibit downstream signaling pathway through dephosphorylation. To determine if this mechanism could be involved in the regulation of melanogenesis by CLEC12B in melanocytes, we generated an ITIM domain mutant of CLEC12B by replacing the central tyrosine by a phenylalanine amino acid. First, we verified if CLEC12B can recruit the phosphatases. Co-

immunoprecipitation assay using lysates of melanocytes stably transduced with Ov-control, Ov-CLEC12B or Ov-CLEC12B ITIM mutant showed an increased phosphatase SHP-1 and SHP-2 co-immunoprecipitation in melanocytes transfected with Ov-CLEC12B. On the other hand, the mutation of the ITIM domain prevents the co-immunoprecipitation, demonstrating that the tyrosine of the ITIM domain is essential for the interaction between CLEC12B and the phosphatases (Figure 4c). We further studied the impact of this ITIM mutant of CLEC12B on the downstream pathway. Western blot analysis of the proteins extracted from melanocytes transfected with the mutant showed that the effect of CLEC12B overexpression on pSHP-1 and p-SHP2 and the melanocytic enzymes is prevented when melanocytes are transfected with the ITIM mutant (Figure 4d). The ITIM mutant of CLEC12B also prevents the decreased pigmentation in CLEC12B overexpressed melanocytes (Figure 4e) and their melanin content (Figure 4f).

To date, CLRs are thought to have a restricted role in the inflammation and immunity processes. Interestingly, attractin, a C-type lectin protein was shown to play a role in mouse hair pigmentation by interacting with agouti protein and downstream affecting the MC1R/cAMP pathway(14). Here, we show that CLEC12B affects skin pigmentation in humans, thus demonstrating that CLRs exert function beyond immunity and inflammation. CLEC12B is expressed by melanocytes, thus explaining its marked decreased expression in vitiligo skin devoid of melanocytes. Interestingly, we show that the expression of CLEC12B is strong in fairly pigmented skin, while it is significantly reduced in the dark skin subjects. These results are in accordance with the inhibitory effect of CLEC12B on melanogenesis and suggest that CLEC12B is likely to play a role in constitutive pigmentation. Modulation of CLEC12B expression profoundly affects pigmentation not only *in vitro* but also in human reconstructed epidermis model. The identification of CLEC12B as a key melanocytic gene opens new therapeutic perspectives for treating pigmentary disorders.

METHODS

Skin samples were supplied from the Departments of Dermatology and Pathology of CHU Nice, France

Additional methods are provided in the Supplemental Methods.

Authors contributions

LS conceived and performed the experiments. TP supervised the work and conceptualized the experiments. LS and TP analyzed the data and wrote the manuscript. RM and EV provided material and help for the lentivirus production. CR helped with immunofluorescence staining of the skin. MH and HTM helped performing the western blot analyses. NN analyzed and made figures for the bio informatics analysis of microarray data. MKT assisted with statistical analyses, data interpretation and manuscript writing. YC performed qPCR experiments. NCL performed and interpreted the immunohistochemical analyses. ASG and DD performed the proteomic analyses. FG and HM performed the mutagenesis of CLEC12B and helped producing lentiviruses-transduced cell lines. MKT, YC, HM, GMDD, and SR provided expertise and feedback on experiments and manuscript draft. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the GIS-IBISA multi-sites platform Microscopie Imagerie Côte d'Azur (MICA), the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M, INSERM U1065) microscopy and imaging facility supported by Conseil Régional, Conseil Départemental, and IBISA, and particularly the expertise of platform managers Maéva Gesson and Marie Irondele. We are grateful to Corine Bertolotto and Robert Ballotti for their great scientific inputs.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by a grant from the French Society of Dermatology

Competing interests: There is no competing interest

References

1. Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wakamatsu K, Zmudzka BZ, et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2007;20(1):2-13.
2. Sato S, Roberts K, Gambino G, Cook A, Kouzarides T, and Goding CR. CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene*. 1997;14:3083-92.
3. Busca R, and Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2000;13(2):60-9.
4. Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol*. 1998;142(3):827-35.
5. Regazzetti C, Joly F, Marty C, Rivier M, Mehul B, Reiniche P, et al. Transcriptional Analysis of Vitiligo Skin Reveals the Alteration of WNT Pathway: A Promising Target for Repigmenting Vitiligo Patients. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(12):3105-14.
6. Zelensky AN, and Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal*. 2005;272(24):6179-217.
7. Lech M, Susanti HE, Rommele C, Grobmayr R, Gunthner R, and Anders HJ. Quantitative expression of C-type lectin receptors in humans and mice. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):10113-31.
8. Szolnok G, Bata-Csorgo Z, Kenderessy AS, Kiss M, Pivarsci A, Novak Z, et al. A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(2):205-13.

9. Sheikh H, Yarwood H, Ashworth A, and Isacke CM. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 6):1021-32.
10. Weis WI, Taylor ME, and Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 1998;163:19-34.
11. Chiffolleau E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2018;9:227.
12. Hoffmann SC, Schellack C, Textor S, Konold S, Schmitz D, Cerwenka A, et al. Identification of CLEC12B, an inhibitory receptor on myeloid cells. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(31):22370-5.
13. Daron M, Jaeger S, Du Pasquier L, and Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev.* 2008;224:11-43.
14. He L, Gunn TM, Bouley DM, Lu XY, Watson SJ, Schlossman SF, et al. A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity. *Nature genetics.* 2001;27(1):40-7.

Figures

Figure 1. Identification of melanocyte specific marker CLEC12B in human skin.

Microarray data comparing lesional skin (LS) from vitiligo subjects to healthy skin (HV) **(a)** or to non-lesional skin (NLS) from vitiligo subjects **(b)**, n=10 patients. Volcano plots (Left panel) showing the distribution of differentially expressed mRNA between samples. Differentially expressed mRNA were selected using an adjusted P-value (FDR) < 0.05. Down-regulated mRNA (Log₂(Fold Change) < -1) are shown in green and up-regulated mRNA (Log₂(Fold Change) > 1) are shown in red. Heatmaps (center panels) depicting relative mRNA expression (Z-score) changes for the top 20 most differentially expressed genes. Boxplots (right panels) comparing the mRNA expression levels of genes differentially expressed between samples. P-values were calculated by the Wilcoxon rank sum test. **(c)** Immunofluorescence staining performed on human skin samples demonstrated colocalization (yellow) of CLEC12B (green) with a melanocyte-specific transcription factor (red, MITF) Scale bars = 25µm. **(d)** CLEC12B mRNA expression level relative quantity was examined by qPCR in the 3 main cell types of human skin (fibroblasts, keratinocytes and melanocytes). n=4 skin samples from individual donors, Nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, qPCR results are normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold-change in mRNA expression relative to the fibroblasts samples. Results were represented using ImageJ analysis tools and shown as box and whisker plots with bars representing 5 to 95% confidence interval. **(e)** CLEC12B mRNA relative expression level was examined by qPCR in light and dark pigmented donors. n=5 donors per condition. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold change in mRNA expression relative to the light pigmented donor samples. Non parametric Mann-Whitney test was used, differences were considered significant when P<0.05. **(f)** IHC of CLEC12B was performed on human skin samples of light

pigmented skin (phototype I/II = subjects 1, 2, 3) and dark pigmented skin (phototype V/VI = subjects 4, 5, 6). Melanin was visualized as brown and CLEC12B as a red stain. Inset represent enlarged images of a selected positive staining zone. Scale bars = 25 μ m.

Figure 2. CLEC12B modulates melanogenesis in normal human melanocytes.

Lentiviral infection was used to silence (Sh-CLEC12B) or overexpress CLEC12B (Ov-CLEC12B) in phototype III/IV melanocytes. **(a)** CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold change relative to control. The variation of pigmentation observed in cells pellets **(b)** and in live cells **(c)** was semi-quantitated using a melanin assay **(d)**. Melanin production was calculated by normalizing the melanin values with protein content. Results were expressed as a Log₂(fold change) of melanin content relative to the control and shown as individual columns *per donor* (sh-CLEC12B: n=7 donors, Ov-CLEC12B: n=6 donors, Nonparametric Wilcoxon test). **(e)** Tyrosinase activity was assessed by a tyramide-based tyrosinase assay (Scale bars = 20 μ m) and fluorescence intensity was quantitated **(f)** using ImageJ analysis tools with bars representing 5 to 95% confidence intervals (n=15 sh-Control, n=38 sh-CLEC12B#3, Differences between groups were tested using nonparametric Mann-Whitney test and were considered significant when P<0.05).

Figure 3: CLEC12B modulates pigmentation in reconstructed human skin.

Reconstructed skins were composed of keratinocytes cultured in presence of phototype III/IV melanocytes transduced with lentivirus to silence (Sh-CLEC12B) or to overexpress CLEC12B

(Ov-CLEC12B). The variation of pigmentation was observed in **(a)** skin constructs and **(b)** by transmitted light microscopy. Melanin pigments were visualized with Fontana-Masson and Eosin stain **(c)** and quantified using image J software **(d)** Scale bars = 50 μm , n=30 quantitated images per condition. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test was used and results are shown as box and whisker plots with bars representing 5 to 95% confidence interval. **(e)** Melanin production was assessed using a melanin assay. Melanin values were normalized with protein content. (n=4 reconstructed skin *per* condition). Results are expressed as a Log_2 (fold change) of melanin content relative to the control and shown as individual column representing each quantitated reconstruct skin. Differences between groups were tested using nonparametric Friedman test with Dunn's multiple comparisons test and considered significant when $P < 0.05$.

Figure 4: CLEC12B regulates melanogenesis pathway by recruiting SHP-1 and SHP-2.

(a) CREB, MITF, TYR, DCT and TRP1 protein expression levels were analysed by western blot in Sh-control, Sh-CLEC12B, Ov-Control and Ov-CLEC12B melanocytes. **(b)** Treatment with 1 μM of a proteasomal degradation inhibitor (MG132) for 4h abolished the decrease of CREB protein levels in Ov-CLEC12B. Beta-actin was used as a loading control. **(c)** Lentiviral infection was used to overexpress wt CLEC12B (Ov-CLEC12B) or an ITIM mutant of CLEC12B (Ov-CLEC12B ITIM mutant) in phototype III/IV melanocytes. Lysates were immunoprecipitated using control IgG or anti-CLEC12B antibodies and samples were analysed by Western blotting for co-immunoprecipitated SHP-1 and SHP-2 and total immunoprecipitated CLEC12B. **(d)** Western blot analysis in Ov-Control, Ov-CLEC12B and Ov-CLEC12B ITIM mutant transduced melanocytes. Beta-actin was used as a loading control.

The variation of pigmentation observed in cell pellets **(e)** was quantified using a melanin assay **(f)** (n= 6 donors *per* condition, Nonparametric Wilcoxon test). Melanin production was calculated by normalizing the melanin values with protein content. Results were expressed as Log₂(fold change) of melanin content relative to the control and shown as individual columns representing each donor.

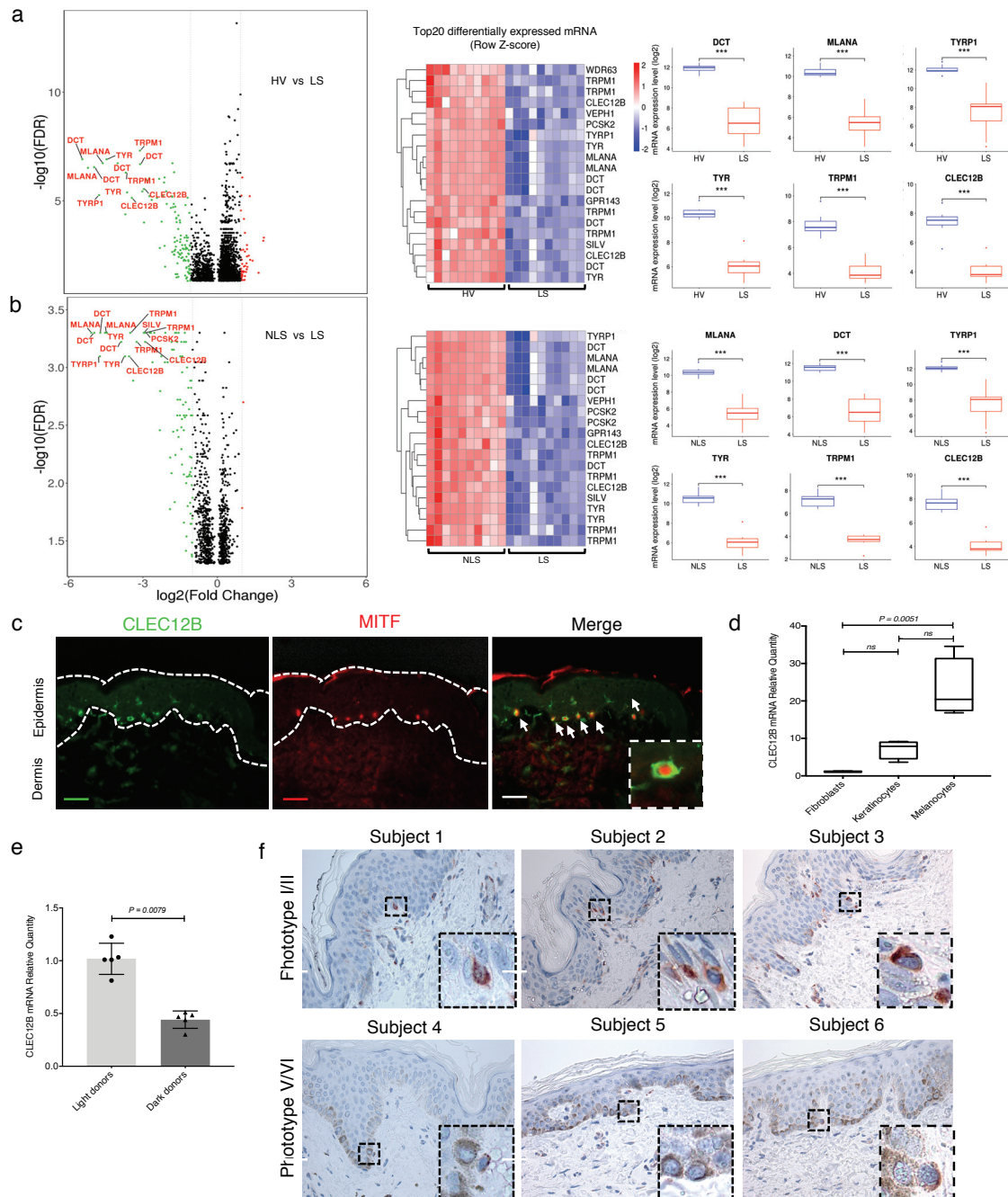


Figure 1. Identification of melanocyte specific marker CLEC12B in human skin

Microarray data comparing lesional skin (LS) from vitiligo subjects to healthy skin (HV) (a) or to non-lesional skin (NLS) from vitiligo subjects (b). N = 10 patients. Volcano plots (Left panel) showing the distribution of differentially expressed mRNA between samples. Differentially expressed mRNA were selected using an adjusted P-value (FDR) < 0.05. Down-regulated mRNA (Log₂(Fold Change) < -1) are shown in green and up-regulated mRNA (Log₂(Fold Change) > 1) are shown in red. Heatmaps (center panels) depicting relative mRNA expression (Z-score) changes for the top 20 most differentially expressed genes. Boxplots (right panels) comparing the mRNA expression levels of genes differentially expressed between samples. P-values were calculated by the Wilcoxon rank sum test. (c) Immunofluorescence staining performed on human skin samples demonstrated co expression between CLEC12B (green) with a melanocyte-specific transcription factor (red, MITF). Scale bars = 25µm. (d) CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR in the 3 main cell types of human skin (fibroblasts, keratinocytes and melanocytes). n = 4 skin samples from individual donors, Nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, qPCR results are normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold-change in mRNA expression relative to the fibroblasts samples. Results were represented using ImageJ analysis tools and shown as box and whisker plots with bars representing 5 to 95% confidence interval. (e) CLEC12B mRNA relative expression level was examined by qPCR in light and dark pigmented donors. n = 5 donors per condition. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold change in mRNA expression relative to the light pigmented donor samples. Non parametric Mann-Whitney test was used, differences were considered significant when P<0.05. (f) IHC of CLEC12B was performed on human skin samples of light pigmented skin (phototype I/II = subjects 1, 2, 3) and dark pigmented skin (phototype V/VI = subjects 4, 5, 6). Melanin was visualized as brown and CLEC12B as red stain. Inset represent enlarged images of a positive staining zone. Scale bars = 25µm.

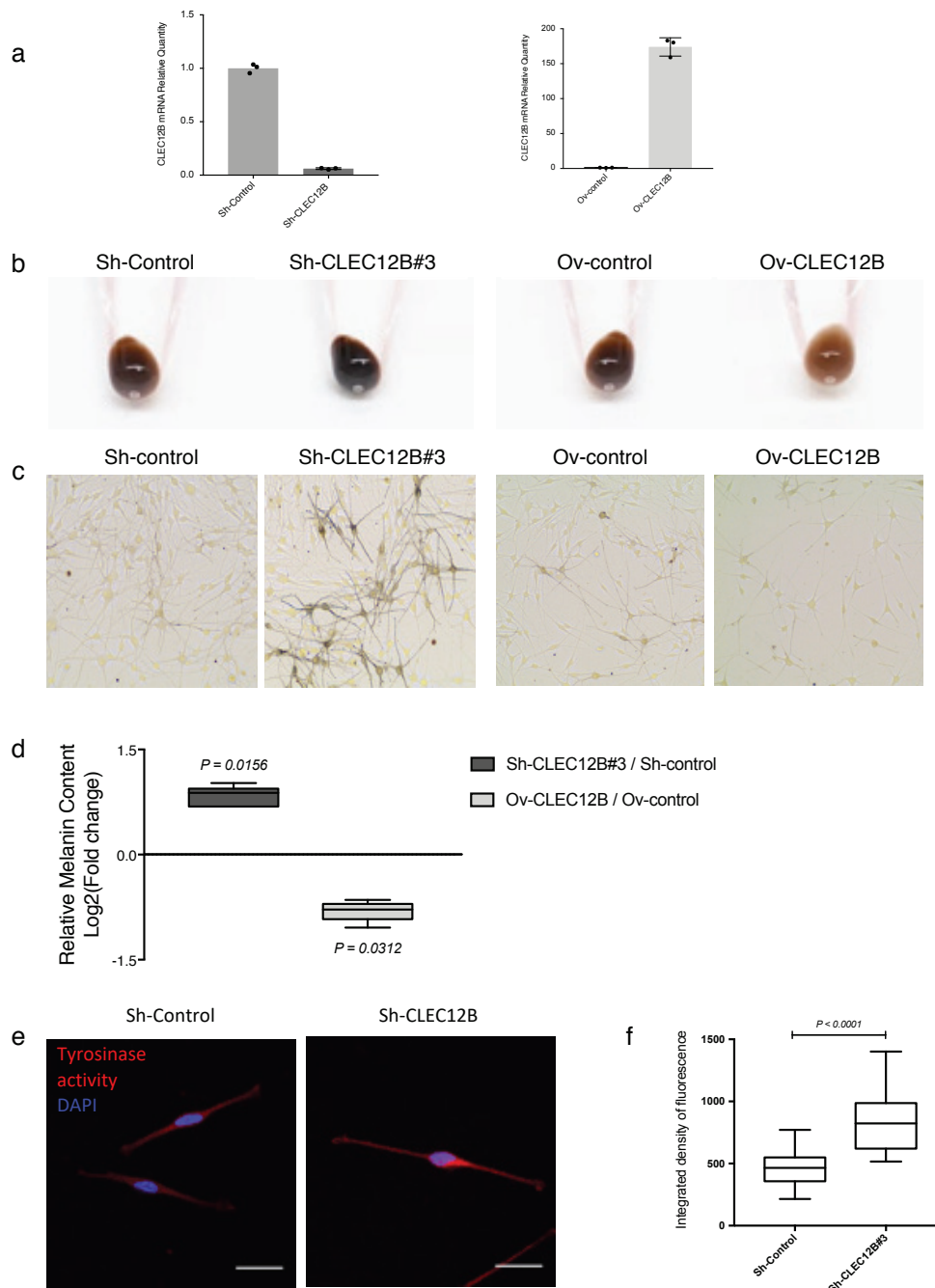


Figure 2. CLEC12B modulates melanogenesis in normal human melanocytes.

Lentiviral infection was used to silence (Sh-CLEC12B) or overexpress CLEC12B (Ov-CLEC12B) in phototype III/IV melanocytes. **(a)** CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold change relative to control. The variation of pigmentation observed in cells pellets **(b)** and in live cells **(c)** was semi-quantitated using a melanin assay **(d)**. Melanin production was calculated by normalizing the melanin values with protein content. Results were expressed as a Log₂(fold change) of melanin content relative to the control and shown as individual columns per donor (sh-CLEC12B : n=7 donors , Ov-CLEC12B : n = 6 donors, Nonparametric Wilcoxon test). **(e)** Tyrosinase activity was assessed by a tyramide-based tyrosinase assay (Scale bars = 20 μ m) and fluorescence intensity was quantitated **(f)** using ImageJ analysis tools with bars representing 5 to 95% confidence intervals (n=15 sh-Control, n=38 sh-CLEC12B#3, Differences between groups were tested using nonparametric Mann-Whitney test and were considered significant when $P < 0.05$).

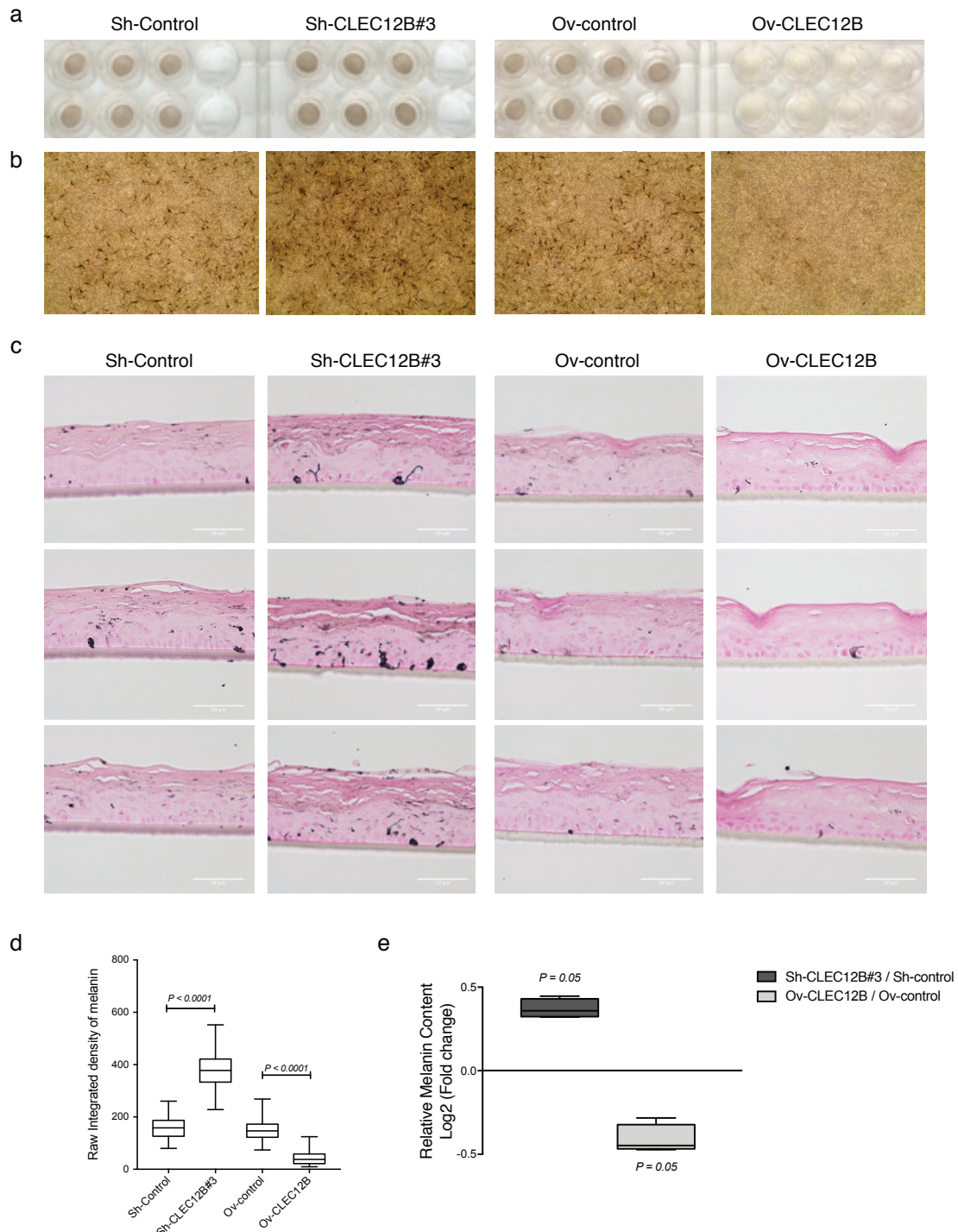


Figure 3. CLEC12B modulates pigmentation in reconstructed human skin.

Reconstructed skins were composed of keratinocytes cultured in presence of phototype III/IV melanocytes transduced with lentivirus to silence (Sh-CLEC12B) or to overexpress CLEC12B (Ov-CLEC12B). The variation of pigmentation was observed in **(a)** skin constructs and **(b)** by transmitted light microscopy. Melanin pigments were visualized with Fontana-Masson and Eosin stain **(c)** and quantitated using image J software **(d)** Scale bars = 50 μ m, n=30 quantitated images per condition) Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test was used and results are shown as box and whisker plots with bars representing 5 to 95% confidence interval. **(e)** Melanin production was assessed using a melanin assay. Melanin values was normalized with protein content. (N = 4 reconstructed skin per condition) Results are expressed as a Log₂(fold change) of melanin content relative to the control and shown as individual column representing each quantitated reconstruct skin). Differences between groups were tested using nonparametric Friedman test with Dunn's multiple comparisons test and considered significant when $P < 0.05$.

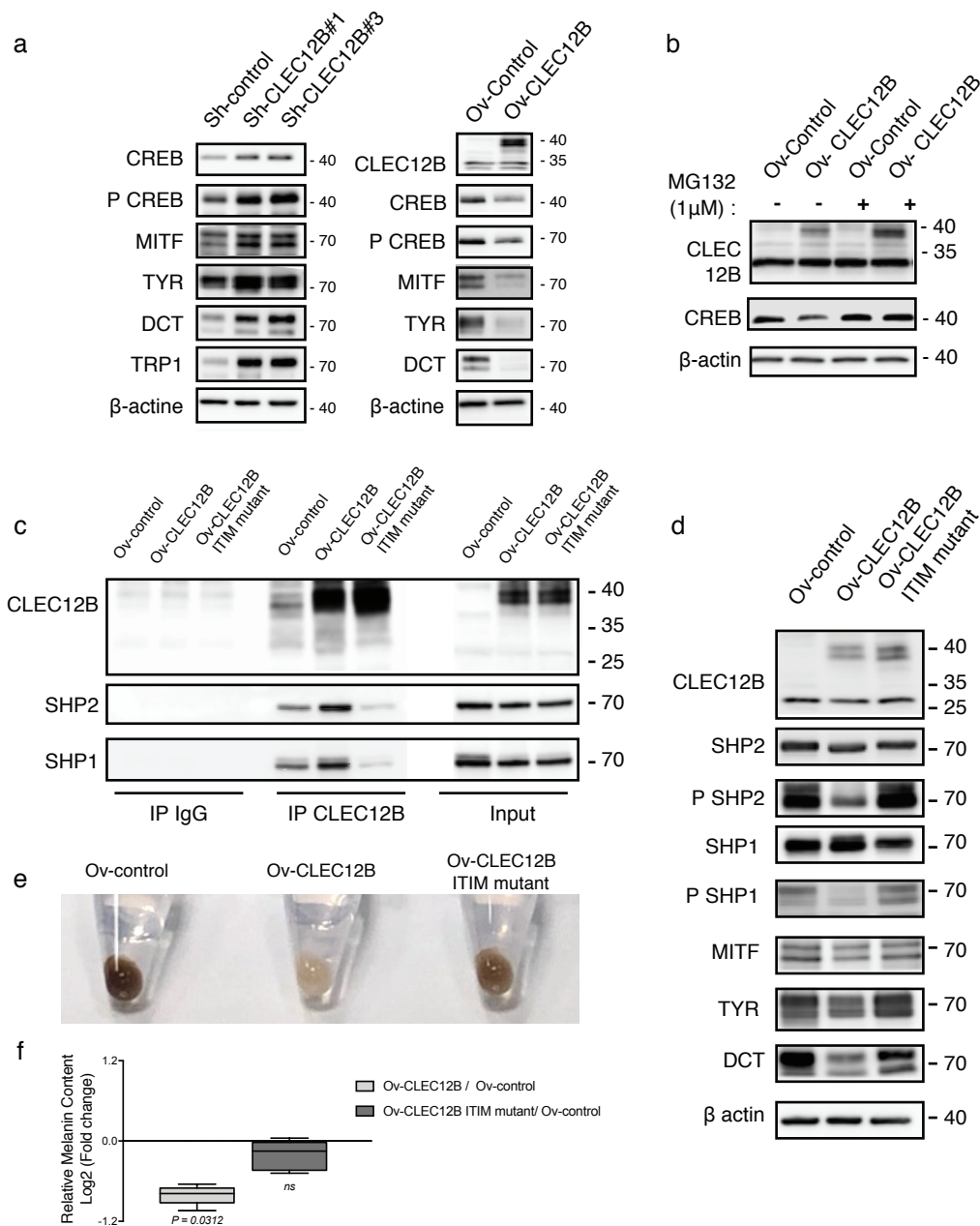


Figure 4. CLEC12B regulates melanogenesis pathway by recruiting SHP1 and 2.

(a) CREB, MITF, TYR and DCT protein expression levels were analysed by western blot in Sh-control, Sh-CLEC12B, Ov-control and Ov-CLEC12B melanocytes. **(b)** Treatment with 1 μ M of a proteasomal degradation inhibitor (Mg132) for 4h abolished the decrease of CREB protein levels in Ov-CLEC12B. Beta-actin was used as a loading control. **(c)** Lentiviral infection was used to overexpress wt CLEC12B (Ov-CLEC12B) or an ITIM mutant of CLEC12B (Ov-CLEC12B ITIM mutant) in phototype III/IV melanocytes. Lysates were immunoprecipitated using control IgG or anti-CLEC12B antibodies and samples were analysed by Western blotting for co-immunoprecipitated SHP-1 and SHP-2 and total immunoprecipitated CLEC12B. **(d)** Western blot analysis in Ov-control, Ov-CLEC12B and Ov-CLEC12B ITIM mutant transduced melanocytes. Beta-actin was used as a loading control.

The variation of pigmentation observed in cell pellets **(e)** was semi-quantitated using a melanin assay **(f)** (n= 6 donors per condition, Nonparametric Wilcoxon test). Melanin production was calculated by normalizing the melanin values with protein content. Results were expressed as Log2(fold change) of melanin content relative to the control and shown as individual columns representing each donor.

***CLEC12B*: A new gene regulating the color of the skin**

Laura SORMANI LE BOURHIS¹, Hélène TAQUIN MARTIN², Rana MHAIDLY¹, Els VERHOEYEN^{1,3}, Claire REGAZZETTI¹, Marjorie HEIM¹, Nicolas NOTTET¹, Meri K TULIC¹, Yann CHELI¹, Gian Marco DE DONATIS¹, Anne Sophie DABERT GAY⁴, Delphine DEBAYLE⁴, Nathalie CARDOT LECCIA⁵, Franck GESBERT⁶, Henri MONTAUDIE^{1,2}, Stéphane ROCCHI¹ and Thierry PASSERON^{1,2}

SUPPLEMENTARY FILES

METHODS

Cell culture

Normal human melanocytes (NHMs), normal human keratinocytes (NHKs) and normal human fibroblasts (NHFs) were obtained from the foreskin of young children (skin type based on experimental question) undergoing circumcision. Tissue samples were kindly supplied by the Department of Pediatric Surgery, Lenval Hospital (Dr. Kurzenne, Nice, France). The samples were washed with phosphate buffered saline (PBS) containing 1% Antibiotic/Antimycotic (Gibco, Life Technologies, USA) 3 times for 5 minutes each. After removal of the subcutaneous tissue, tissue was cut into $2 \times 2 \text{ mm}^2$ pieces. The foreskin samples were incubated with dispase enzyme (4U/ml, Roche) for 12–16 hours at 4 °C. Once the dermis and epidermis of foreskins were separated with forceps, tissue pieces of dermis were transferred to the bottom of a culture dish and cultured with 10ml of DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, USA) media supplemented with 10% FBS to obtain NHFs. The epidermis was incubated within a trypsin/EDTA solution for 20 minutes at 37 °C, the cells dispersed into cell suspensions and filtered by cell strainer (70 μm , Falcon) before final wash with PBS. NHMs were isolated in MCDB 153 medium (Sigma Aldrich) supplemented with 2% FBS (Fetal Bovin Serum, SV30160-03, Hyclone, USA), 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ insulin (Sigma Aldrich), 0.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ hydrocortisone (Sigma Aldrich), 16 nM TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate , Sigma Aldrich), 1 ng.ml^{-1} basic fibroblast growth factor (Promega), 15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ bovine pituitary extract (Gibco, Life Technologies), 10 μM forskolin (Sigma Aldrich), and 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ geneticin (Invitrogen) over 2 weeks or until we obtain pure melanocytes population. Melanocytes between passages 2 and 6 were used. NHKs were isolated in keratinocyte growth medium with supplement (PromoCell). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Lentivirus production and transduction

Self-inactivating HIV-1–derived vectors were generated by transient transfection of HEK 293T cells as described (1). Viral vectors were produced pseudo typed with VSV-G. Transfection was performed by using the classical calcium phosphate method. For VSV-G-LV preparation, 3µg of phCMV-VSVG plasmid was co-transfected with a Gag-Pol packaging plasmid (PAX2) and a plasmid encoding a self-inactivating LV.

For the overexpression of CLEC12B, we used CLEC12B Lentiviral Vector pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro (Cat No LV796325, Applied Biological Materials) custom (Use of CDS of CLEC12B accession Number NM_001129998 - transcript variant 1) and the control plasmid Blank Vector pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (LV590).

For the silencing of CLEC12B, we used the MISSION shRNA plasmid DNA (Sigma Aldrich):

- Sh-CLEC12B#1: NM_205852 / TRCN0000164269 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP
- Sh-CLEC12B#2: NM_205852 / TRCN0000160830 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP
- Sh-CLEC12B#3: NM_205852 / TRCN0000159325 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP

The two constructs with the best knockdown efficiency (tested using qPCR) were chosen for *in vitro* experiments. As a negative control we used the MISSION Non-Target shRNA Control Vector (Sigma Aldrich, Catalog Number SHC002).

Viral supernatant was harvested 48 hours after transfection and filtered through a 0.45 µm cellulose acetate filter. Low-speed concentration of the vectors was performed by overnight centrifugation of the viral supernatant at 3000g at 4°C. To determine transduction efficiency and infectious titers of HIV vectors, serial dilutions of vector preparations were added to 293T cells. The infectious titers are expressed as 293T transducing units per milliliter (TU/mL).

NHMs were serially passaged and used at passage 3 for viral infection. Cells were seeded on 6-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and infected with a multiplicity of infection of 20. Cells were incubated with virus for 72 hours. The infected cells were selected for stable expression using puromycin at 1µg/ml. Infected NHMs were cultured in medium 254

supplemented with human melanocyte growth supplement (Cascade Biologics, CA, USA).

Site-directed Mutagenesis of CLEC12B

The CLEC12B Y→F mutation was generated by site-directed mutagenesis (QuikChange II ® XL Site-Directed Mutagenesis; Stratagene, Agilent Technologies, Les Ulis, France), according to the kit manufacturer's instructions. The following primers were used (the substituted nucleotides are shown in bold and underlined):

- CLEC12B Y→F-forward: 5'-GTCTGAAGAAGT**GACCTTCGCGACACTCACAT**TTC-3'

- CLEC12B Y→F-reverse: 5'-GAAATGTGAGT**GTTCGCGAAGGTCAC**TTCTTCAGAC-3'

Mutations were verified by DNA sequencing (MWG-Eurofins).

Melanin assay

Melanin content was measured as previously described (2). Briefly, cell suspensions were centrifuged, pellets were photographed and then solubilized in 120 µl of 0,5N NaOH at 80 °C for 1 hours to dissolve melanin. Melanin absorbance was measured spectrophotometrically at 405 nm using a plate reader. Melanin production was calculated by normalizing the total melanin values with protein content.

Co-Immunoprecipitation

After washing with PBS, cells were lysed in NP40 lysis buffer containing protease inhibitors (Roche), phosphatase inhibitors (Roche) and Sodium Orthovanadate (Cat# AK-102V-L, Jena Bioscience). The supernatant was collected, centrifuged at 13000g for 10 min and assayed for protein concentration using the BCA kit (Pierce). 500 µg of total proteins diluted in 500µl of lysis buffer was incubated with 2µg of CLEC12B antibody, under agitation for 30 min at room temperature. After three washes with lysis buffer, the magnetic beads (Ademtech Bio-

adembeads PAG 0463) were added to the cell lysates and incubated overnight at 4°C under agitation. The target protein was eluted (PAG elution buffer, Cat# 10701, Ademtech) and analyzed by Western Blot.

Western Blot Analysis

After washing with PBS, cells were lysed in RIPA buffer (Cat# 89900, Thermo scientific) containing protease inhibitors (Cat# 04693159001, Roche) and phosphatase inhibitors (Roche). After sonication the supernatant was collected, centrifuged at 13000g for 10 minutes and assayed for protein concentration using the BCA kit (Pierce). Total protein (20-30 µg) was separated by electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membrane (Millipore). Blocking was performed in Tris-buffer saline containing 3% BSA. Membranes were incubated with the appropriate primary antibodies at a dilution of 1:1000 overnight at 4°C. After washing three times, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1h. Bound antibodies were detected using an enhanced chemiluminescence plus kit (GE Healthcare).

RT-qPCR

RNA was extracted from cell pellets using RNeasy mini kit (Qiagen, Germany) and quantified by spectrophotometry at 260 nm. The cDNA was synthesized in a 20 µL reaction containing 1 µg of RNA and Reverse Transcription system kit (Cat#A3500, Promega) according to the manufacturer's protocol. Real-time qPCR was performed using power SYBER Green mix (Cat#4367659, Applied Biosystem) and specific primers directed against CLEC12B (F/TGAGGAGAAAACCTGGGCTA ; R/GCCAGAGGAGTCCCATGATA) and CREB (F/TTAACCATGACCAATGCAGCA ; R/TGGTATGTTTGTACGTCTCCAGA) and results

are normalized to the house-keeping gene SB34 (F/TGCATCAGTACCCCATTCTATCA ; R/AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGA).

Histochemistry of reconstructed 3D skin model

The reconstruction of the 3D skin model (skinEthic RHPE) was performed by EPISKIN (Lyon, FRANCE) using our in-house melanocytes that were silenced for CLEC12B (Sh-CLEC12B) or in which melanocytes were overexpressed (Ov-CLEC12B) as described above. The reconstructed epidermis was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin. 5- μ m sections were processed for Fontana Masson staining to visualize melanin pigments.

Fontana Masson Stain

Tissue sections were deparaffinized and hydrated with the conventional protocol. Each of the successive steps was followed by three washes in distilled water.

Tissue sections were incubated in a warmed (60°C) ammoniacal silver solution (Sigma-Aldrich, Cat # HT2001) for 30 min until tissue section became brown in color.

The sections were toned by dipping in a gold chloride solution (Sigma-Aldrich, Cat # HT2002) for 30 seconds. The fixation of silver was carried out with 2% sodium thiosulfate (Sigma-Aldrich, Cat # HT2003) for 1-2 min. The nuclear contrast was performed with Nuclear fast red solution (Sigma-Aldrich, cat # 3020) for 5 min. The sections were dehydrated, cleared in xylene, and mounted in hydrophobic medium (Richard-Allan Scientific Mounting Medium, Cat # 4112). The sections were examined under a Nikon Eclipse Ci microscope (Nikon, Japan), using dry 10X NA 0.25 and 20X NA 0.40 objectives. Acquisitions were done with a DS – Ri 1 camera (Nikon, Japan).

Pigmentation intensity measurements were done using ImageJ whereby color images were converted to 8 bit images and tissue region of interest (ROI) and thresholds were done manually

in order to select only melanin containing areas. The sum of intensities (*Raw Integrated Density, RID*) in melanin containing areas and total tissue areas are measured. Results are expressed as a ratio between these two parameters. (3). For the statistical analyses, 30 images of each conditions were quantified.

Immunofluorescence staining (fixed cells)

Cells were seeded on coverslips for at least 24h and subsequently washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, permeabilized 5 minutes with 0.1% Triton X-100, blocked 1 h with PBS 3%BSA 5% normal goat serum and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (see Supplemental Table S1). The cells were then washed three times with PBS and incubated with fluorescent dye conjugated secondary antibody (see Supplemental Table S1) at room temperature for 1 h. For actin cytoskeleton staining, cells were incubated with Phalloidin-X-TexasRed (1:100, Life Technologies, Cat # T7471) for 30 minutes at room temperature. Slides were mounted with Dapi Fluoromount-G (Southern Biotech, Cat # 0100-20). Fluorescence was detected using a confocal microscope (Nikon A1R, Nikon Instruments, Japan) using objective Plan Apo 63X oil 1.4 NA.

Immunofluorescence staining (tissue)

Skin samples were supplied by the Departments of Dermatology and Pathology of CHU Nice, France

After dissection and washes in PBS, skin biopsies were embedded in Tissue-Tek O.C.T medium in cryomolds, snaps-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (2-methyl butane) and stored at -80°C before cutting. Tissue was cut with microtome into 7µm sections and fixed on Superfrost Plus slides. After 20 min of air drying, sections were fixed in ice-cold acetone (30 min at -20°C) and saturated for 2 h at RT with PBS 5% BSA 3% normal goat serum. Sections

were incubated overnight at 4°C with specific antibodies directed against CLEC12B and MITF (see Supplemental Table S1). The next day, sections were then washed three times with PBS and incubated with fluorescent dye conjugated secondary antibody (see Supplemental Table S1) at room temperature for 1 h. Slides were mounted with Prolong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (Thermofisher). Fluorescence was detected using a confocal microscope (Nikon A1R, Nikon Instruments, Japan) using objective Plan Apo 63X oil 1.4 NA.

Tyramide-based Tyrosinase assay (TTA)

TTA is performed in order to assess tyrosinase activity *in situ*. In the TTA procedure, tyrosinase reacts with biotinyl tyramide (structural analog to the natural substrate of tyrosinase), generating biotinylated deposits of substrate near the enzyme that are visualized with streptavidin conjugated to a fluorescent dye. Cells were seeded on coverslips for at least 24h and subsequently washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with PBS 5% BSA. To enhance assay specificity and avoid potential sources of background, peroxidases are quenched by treatment with hydrogen peroxide 3% for 10 mins. To block all endogenous biotin, biotin receptors, and avidin binding sites, cells were incubated in AvidinD solution for 15 minutes followed by three washes in PBS before incubated in biotin solution for 15 minutes (Cat No. SP-2001, Vector laboratory). Cells were incubated with biotinyl tyramide (Cat No. NEL700A001KT, Perkin Elmer) for 15 mins at room temperature followed by three washes in PBS. Finally, to detect biotinylated substrates, cells were incubated with streptavidin Texas red conjugate for 1h at room temperature. After three washes, slides were mounted with Prolong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (Thermofisher). Fluorescence was detected using a confocal microscope (Nikon A1R, Nikon Instruments, Japan) using objective Plan Apo 63X oil 1.4 NA.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Graphpad Prism 6 software. Mann Whitney non-parametric analysis was used to test unpaired differences between 2 groups. For multiple comparisons, we used Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's post Hoc analysis. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Transcriptomic analysis

Ten patients with active non-segmental vitiligo, which is defined by the occurrence or the worsening of depigmented lesions in the past 3 months and having hypochromic borders upon Wood's lamp examination, were enrolled in the study after informed, written consent was obtained. The study was approved by the local ethics committee (N12.034). A 4-mm-skin biopsy was taken from each patient in the center of a vitiligo patch, in the perilesional area (defined as 5 mm outside of the lesion border), and in non-lesional skin located in the same area but at least 3 cm from a depigmented lesion. A 4-mm biopsy was also taken from 10 healthy patients and served as a control that was matched for gender, age, and location.

Biopsies for the microarray analysis were stored in RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Venlo, The Netherlands) until use. For RNA extraction, the samples were homogenized with a potter in Qiagen lysis buffer (Qiagen). Total RNA was extracted using RNeasy extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA quantity was measured using a Nanodrop Spectrophotometer ND8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA quality was monitored using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Probes were synthesized and then hybridized on Affymetrix U133 Plus 2.0 chips (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). All chips were normalized using the robust multi-array average method (4). Only Affymetrix identifiers (IDs) with expression $\geq 2^{\text{exp}6(64)}$ for at least 7 out of 10 samples in at least 1 sample group (lesional (LS), non-lesional (NLS), perilesional (PLS), or healthy) were selected. Finally, 29,906 of 54,675 IDs that were initially present were

kept for statistical analyses, and thresholds of modulation of 1.5 and of -1.5 were selected for further analyses. Data analysis was performed on Array Studio software (OmicSoft, Cary, NC, USA). A two-sided paired Student's *t*-test was performed. The Benjamini-Hochberg procedure (1995) was used for correction of multiple testing. The raw data are available at NCBI GEO, accession number GSE65127.

Proteomic identification (Master Protein with High FDR)

For Mass spectrometry analysis proteins contained into gel slices were reduced/alkylated and digested by a treatment with DTT/IAA and trypsin. Peptides extracted were separated using a nano HPLC (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). The peptides separation was performed on a 75 μm i.d. \times 250 mm (3 μm , 100 \AA) Acclaim PepMap 100 C18 column (Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 300 nL/min. Solvent systems were: (A) 100% water, 0.1% FA, (B) 100% acetonitrile, 0.08% FA. The following gradient was used $t = 0$ min 6% B; $t = 3$ min 6% B; $t = 119$ min, 45% B; $t = 120$ min, 90% B; $t = 130$ min 90% B (temperature at 35 $^{\circ}\text{C}$). Nano HPLC was coupled to Q-exactive *plus* mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). MS spectra were acquired at a resolution of 70,000 (200 m/z) in a mass range of 300–2000 m/z with an AGC target 3e6 value of and a maximum injection time of 100 ms. The 10 most intense precursor ions were selected and isolated with a window of 2 m/z and fragmented by HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) with normalized collision energy (NCE) of 27. MS/MS spectra were acquired in the ion trap with an AGC target 2e5 value, the resolution was set at 17 500 at 200 m/z combined with an injection time of 100 ms. Data were reprocessed using Proteome Discoverer 2.1 equipped with Sequest HT. Files were searched against the Swissprot Homo sapiens FASTA database (update of September 2018). A mass accuracy of ± 10 ppm was used to precursor ions and 0.02 Da for product ions. Enzyme specificity was fixed to trypsin, allowing at most two miscleavages. Because of the previous chemical modifications,

carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification and only oxydation of methionine was considered as a dynamic modification. Reverse decoy databases were included for all searches to estimate false discovery rates, and filtered using the Percolator algorithm at a 1% FDR.

References

1. Sallets, A., Robinson, S., Kardosh, A. & Levy, R. 2018. Enhancing immunotherapy of STING agonist for lymphoma in preclinical models. *Blood Advances*, 2230-2241.
2. Bellei, B., Maresca, V., Flori, E., Pitisci, A., Larue, L., and Picardo, M. 2010. p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase. *J Biol Chem* 285:7288-7299.
3. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.
4. Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., and Speed, T.P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185-193.

Supplemental Table S1. List of primary antibodies used in the study

Primary antibody	Source Isotype	Supplier	Catalog number
CLEC12B	Rabbit	Proteintech	26 077-1-AP
CREB	Rabbit IgG	Cell Signaling Technology	9197
Phospho CREB (Ser133)	Rabbit IgG	Cell Signaling Technology	9198
SHP1	Mouse IgG ₁	BD Transduction Laboratories	610125
Phospho SHP1 (Tyr 564)	Rabbit IgG	Cell Signaling Technology	8849
SHP2	Mouse IgG ₁	BD Transduction Laboratories	610621
Phospho SHP2	Rabbit	Cell Signaling Technology	3751
MITF	Mouse	Abcam	Ab12039
TYR	Rabbit	In house (<i>V.J. Hearing, 2001</i>)	-
DCT	Rabbit	In house (<i>V.J. Hearing, 2001</i>)	-
TRP1	Mouse	Abcam	Ab3312
β -Actin	Mouse	Santa-Cruz	Sc-47778
HSP90	Mouse	Santa-Cruz	Sc-13119
TexasRed-X-Phalloidin		LifeTechnologies	T7471
Secondary antibody (WB)			
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP		Dako	P0448
Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP		Dako	P0447
Secondary antibody (IF)			
Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG		Invitrogen	A11034
Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG		Invitrogen	A11032

Supplementary figure legends

Figure S1. Cytoplasmic and membrane subcellular localization of CLEC12B in melanocytes.

(a) Immunofluorescence staining of CLEC12B performed on fixed melanocytes shows cytoplasm subcellular localization. Alexafluor 594 phalloidin staining of actin cytoskeleton was used to visualize cell morphology, Alexafluor 488 secondary antibody was used to reveal CLEC12B staining. Nuclei were stained with DAPI (b) Immunofluorescence staining was performed with CLEC12B antibody on CLEC12B GFP fusion protein transduced melanocytes. Alexafluor 594 secondary antibody was used to reveal CLEC12B staining and DAPI for nucleus staining. (c) Lentiviral infection was used to overexpress CLEC12B GFP fusion protein. Scale bars = 20 μm

Figure S2. Glycosylated form of CLEC12B is detected at 40kDa in CLEC12B overexpressed melanocytes.

(a) CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR in melanocytes transduced with Sh-Control, Sh-CLEC12B sequence #1, #2 or #3. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as fold change relative to Sh-Control. (b) Western Blot analysis of CLEC12B protein expression level in normal human melanocytes transduced with Sh-control and sh-CLEC12B sequence #1 and #3. HSP90 was used as a loading control. (c) Mass spectrometry analysis of proteins contained into gel slices were treated by DTT/IAA and digested by trypsin. Peptides extracted were analyzed by nanoLC-MS/MS. Data reprocessing was done using Protein Discoverer 2.2 against the human reviewed database (Human_reviewed_180910). (d) Glycosylation pattern of CLEC12B in normal human

melanocytes transduced with Ov-control or Ov-CLEC12B and treated with 200nM and 400nM for 4h before protein extraction and western blotting. HSP90 was used as a loading control.

Figure S3. CLEC12B modulates MITF and pigmentation in reconstructed human skin

(a) The variation of pigmentation observed in each skin constructs was quantitated using ImageJ software and shown as scatter plot with bars representing mean with SD. (Sh-control and Sh-CLEC12B: N = 6, Ov-control and Ov-CLEC12B: N = 8). Differences between groups were tested using nonparametric Mann-Whitney test and considered significant when $P < 0.05$.

(b) Western blot analysis of proteins extracted from reconstructed epidermis.

Figure S4. CLEC12B does not affect CREB transcriptional regulation

Relative expression of CLEC12B and CREB mRNA was determined by qPCR in Ov-control and Ov-CLEC12B overexpressed melanocytes. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as a fold change relative to control.

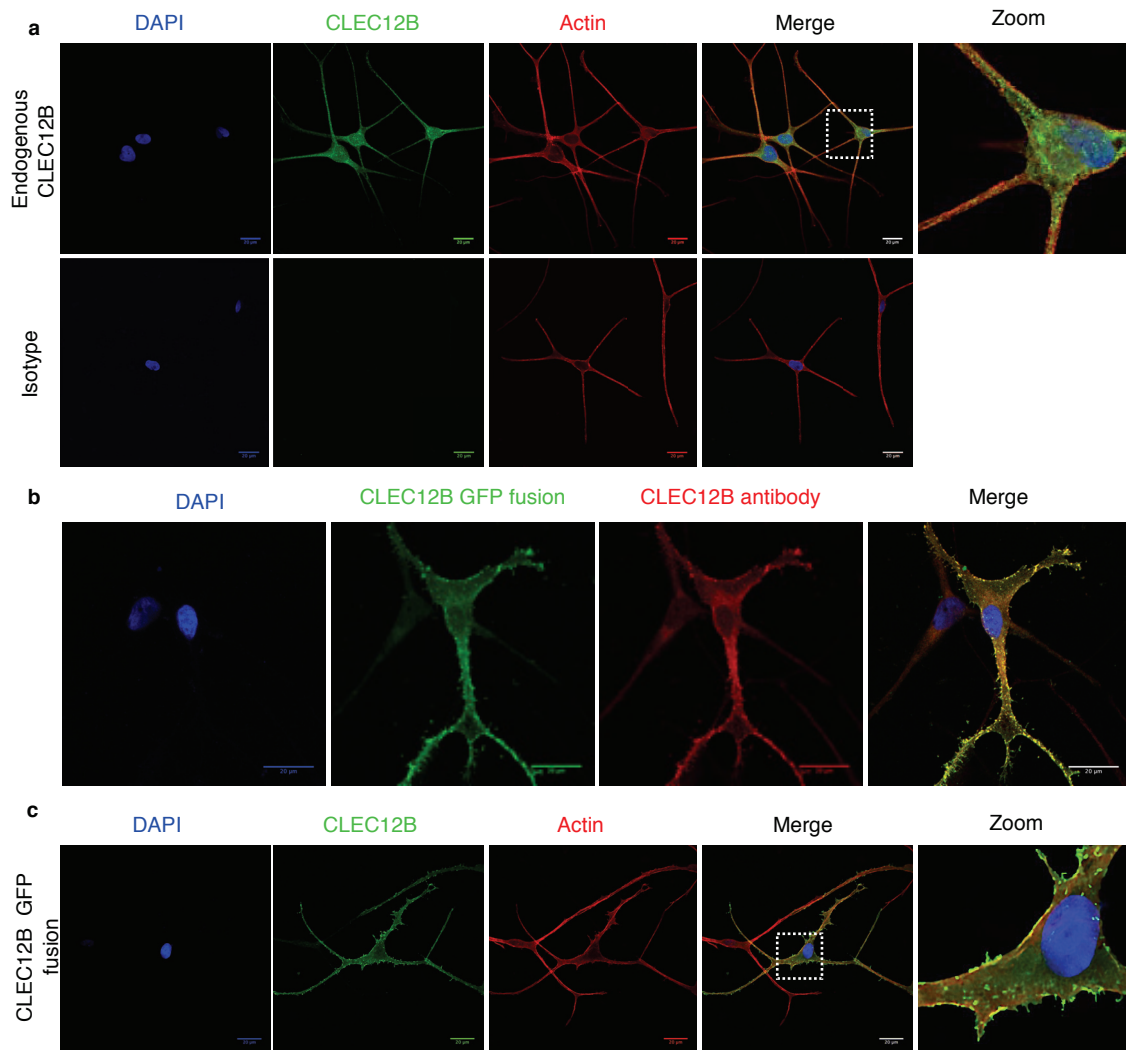


Figure S1. Cytoplasmic and membrane subcellular localization of CLEC12B in melanocytes

(a) Immunofluorescence staining of CLEC12B performed on fixed melanocytes shows cytoplasm subcellular localization. Alexafluor 594 phalloidin staining of actin cytoskeleton was used to visualize cell morphology, Alexafluor 488 secondary antibody was used to reveal CLEC12B staining. Nuclei were stained with DAPI **(b)** Immunofluorescence staining was performed with CLEC12B antibody on CLEC12B GFP fusion protein transduced melanocytes. Alexafluor 594 secondary antibody was used to reveal CLEC12B staining and DAPI for nucleus staining. **(c)** Lentiviral infection was used to overexpress CLEC12B GFP fusion protein. Scale bars = 20 μm.

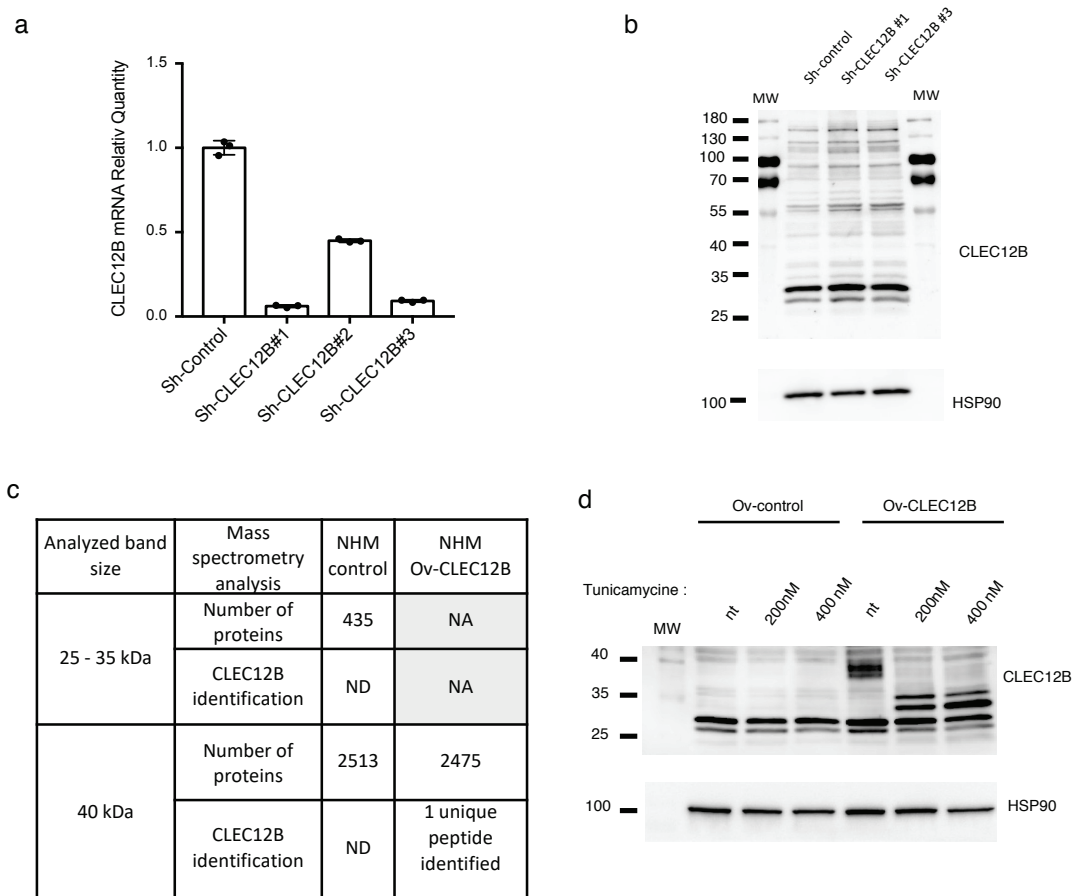


Figure S2. Glycosylated form of CLEC12B is detected at 40kDa in CLEC12B overexpressed melanocytes.

(a) CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR in melanocytes transduced with Sh-Control, Sh-CLEC12B sequence #1, #2 or #3. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as fold change relative to Sh-Control. **(b)** Western Blot analysis of CLEC12B protein expression level in normal human melanocytes transduced with Sh-control and sh-CLEC12B sequence #1 and #3. HSP90 was used as a loading control. **(c)** Mass spectrometry analysis of proteins contained into gel slices were treated by DTT/IAA and digested by trypsin. Peptides extracted were analyzed by nanoLC-MS/MS. Data reprocessing was done using Protein Discoverer 2.2 against the human reviewed database (Human_reviewed_180910). **(d)** Glycosylation pattern of CLEC12B in normal human melanocytes transduced with Ov-control or Ov-CLEC12B and treated with 200nM and 400nM for 4h before protein extraction and western blotting. HSP90 was used as a loading control.

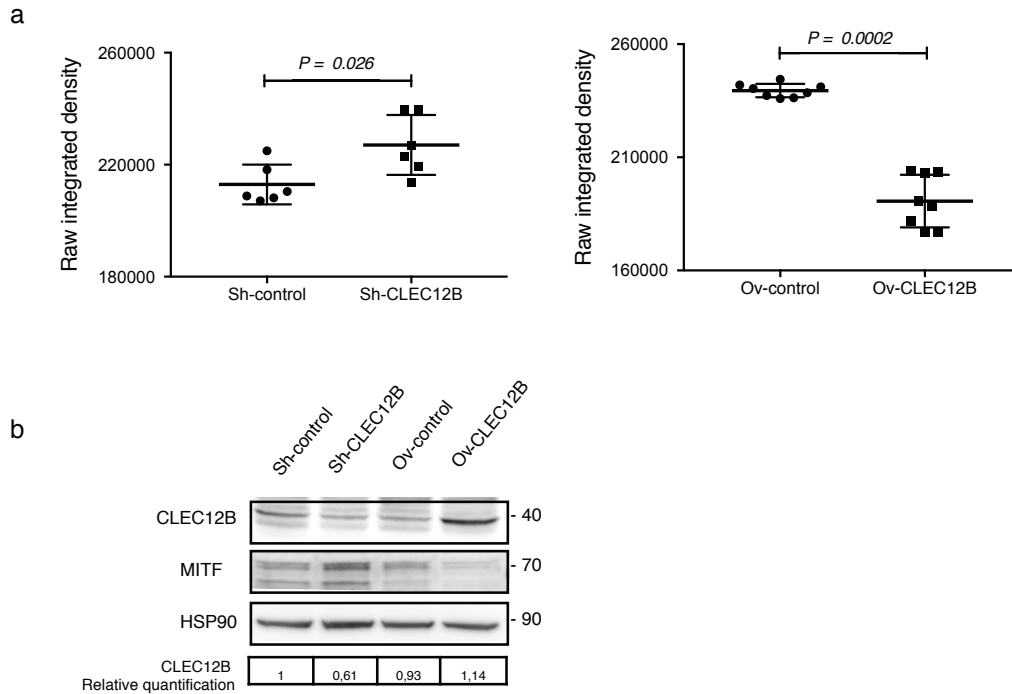


Figure S3. CLEC12B modulates MITF and pigmentation in reconstructed human skin

(a) The variation of pigmentation observed in each skin constructs was quantitated using ImageJ software and shown as scatter plot with bars representing mean with SD. (Sh-control and Sh-CLEC12B : N = 6 , Ov-control and Ov-CLEC12B : N = 8). Differences between groups were tested using nonparametric Mann-Whitney test and considered significant when $P < 0.05$. **(b)** Western blot analysis of proteins extracted from reconstructed epidermis.

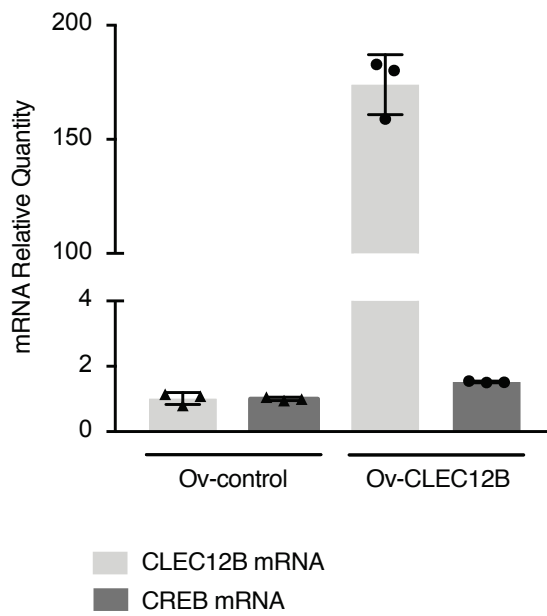


Figure S4. CLEC12B does not affect CREB transcriptional regulation

Relative expression of CLEC12B and CREB mRNA was determined by qPCR in Ov-control and Ov-CLEC12B overexpressed melanocytes. qPCR results were normalized to house-keeping gene SB34 and expressed as fold change relative to control.

Deuxième article (en révisions dans Journal of Clinical Investigation) :

CLEC12B is a tumor-suppressor gene in melanoma that regulates STAT activation

1

***CLEC12B* is a tumor-suppressor gene in melanoma that regulates STAT activation**

RUNNING TITLE: *CLEC12B*: tumor suppressor gene in melanoma

Henri Montaudié^{1,2}, Laura Sormani¹, Bérengère Dadone-Montaudié^{3,4}, Marjorie Heim¹, Nathalie Cardot-Leccia³, Meri K Tulic¹, Guillaume Beranger¹, Anne-Sophie Gay⁵, Delphine Debayle⁵, Yann Cheli⁶, Valérie Petit⁷⁻⁹, Stéphane Rocchi¹, Franck Gesbert⁷⁻⁹, Lionel Larue^{7-9*}, and Thierry Passeron^{1,2*}

*Contributed equally

¹Université Nice Côte d'Azur, INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), team 12, Nice, France

²Université Nice Côte d'Azur, CHU Nice, Department of Dermatology, Nice, France

³Université Nice Côte d'Azur, Department of Pathology, Nice, France

⁴Université Nice Côte d'Azur, CHU Nice, Laboratory of Solid Tumors Genetics, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN) CNRS UMR 7284/INSERM U1081, Nice, France

⁵Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia-Antipolis, France

⁶Université Nice Côte d'Azur, Biology and pathologies of melanocytes, Team 1, Inserm U1065, C3M. Nice, France

⁷Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1021, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France

⁸Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, CNRS UMR 3347, Orsay, France

⁹Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer

Correspondance:

Pr. Thierry Passeron, MD, PhD
Department of Dermatology and C3M INSERM U1065
151 route Saint-Antoine de Ginestière, 06200 Nice, France
Email: passeron@unice.fr

Manuscript word count: 3950

Figures: 4

Tables: 0

Keywords: melanoma, CLEC12B, STAT3, STAT1, STAT5, SHP2

ABSTRACT

Cutaneous melanoma is amongst the most complex cancers. The importance of CLEC12B in melanoma progression is still unknown. Here, we demonstrate that the expression of CLEC12B, a melanocytic gene that we discovered using transcriptome analysis, is lower in melanoma cells and melanoma metastases than benign melanocytic lesions and correlates with a poor patient prognosis. SHP2 and the JAK/STAT pathway have been demonstrated to be involved in cancer. We show that CLEC12B recruits SHP2 through its ITIM domain and inactivates STAT1, 3, and 5 and increases downstream p53/p21/p27 expression/activity. Thus, the overexpression of CLEC12B leads to slowing of the G0-G1 phase of the cell cycle and inhibits melanoma cell proliferation *in vitro*, whereas the opposite is true after its silencing. Melanoma cells overexpressing CLEC12B were xenografted into nude mice, resulting in a significant decrease of tumor growth and STAT3 phosphorylation, with a concomitant increase in p53 within the tumors. There was the opposite effect when the gene was silenced. Our findings show that CLEC12B is a novel tumor-suppressor gene in melanoma that functions by repressing STAT activation and regulating the cell cycle.

INTRODUCTION

Targeted and immune therapies have dramatically changed the landscape of melanoma treatment. However, only a subset of patients (~50%) truly benefit from these new therapies, and only a low percentage of patients are cured (1)(2). These limitations highlight the need for better understanding of the pathogenesis of melanoma to provide new therapeutic targets and strategies. We thoroughly analyzed the transcriptome of the lesional skin of vitiligo patients, which is characterized by the total absence of melanocytes (3), and found that CLEC12B, *C-type lectin domain family 12-member B*, a type II transmembrane protein (4933425B16Rik or UNQ5782), is differentially expressed compared to the non lesional skin of these patients and that of healthy volunteers, with a magnitude comparable to the major melanocytic genes, including DCT, MLANA, TYRP1, and TYR. Our laboratory recently demonstrated that CLEC12B in the skin is selectively and strongly expressed by melanocytes in the epidermis and negatively regulates melanogenesis (Sormani L *et al.* submitted). *CLEC12B* encodes a C-lectin receptor containing an intracellular immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM domain) reported to be expressed by myeloid cells (4).

Here, we show lower expression of CLEC12B in melanoma cells in culture and melanoma metastases than in normal human melanocytes or benign melanocytic lesions (nevi), respectively, which correlates with significantly lower overall survival of patients. We further show that CLEC12B, through the recruitment of SHP2 on its ITIM domain, strongly inhibits melanoma proliferation *in vitro* and in a nude-mouse xenograft model by inhibiting the phosphorylation of STAT1, 3, and 5. Overall, these data identify CLEC12B as a novel tumor-suppressor gene in melanoma.

RESULTS AND DISCUSSION

We investigated the clinical significance of CLEC12B in melanoma by first comparing *CLEC12B* mRNA levels in five human melanoma cell lines (A375, MeWo, Mel501, Skmel28 and WM9), tumor cells established in short-term culture from three patient metastases, and normal human melanocytes (NHMs). The genetic background of the cells is presented (Supplemental Table 1A). Although variable, all eight melanoma cell cultures showed significantly lower expression of CLEC12B than NHMs (Figure 1A). This was confirmed at the protein level in benign and malignant melanocytic tumors from patients (n=44). In accordance with the *in vitro* results, immunohistochemical analysis of CLEC12B revealed a strong and diffuse cytoplasmic expression in benign melanocytic lesions (junctional and dermal nevi [Figure 1, B1-B3]) and a moderate to high expression in thin melanomas (Figure 1, B4-B6). Conversely, expression was weak or undetectable in thick melanomas (Figure 1, B7-B9) and various metastases (Figure 1, B10-B15). The immunohistochemical data are summarized in Supplemental Table 1B. We used the human melanoma dataset generated by The Cancer Genome Atlas (TCGA) to analyze whether overall survival was associated with CLEC12B mRNA levels. The Kaplan-Meier survival analysis for patients in this dataset showed that those with high CLEC12B expression (red curve) showed significantly higher median survival than those with low expression (blue curve, Log-rank Test, p=0.006, Figure 1C). Overall, these correlative data suggest that CLEC12B may play a role in melanoma progression.

We evaluated the biological function of *CLEC12B* in melanoma by examining the effect of its modulation on melanoma-cell proliferation and colony formation. We established stable melanoma cell lines with overexpressed (Ov-CLEC12B, by lentiviral transduction) or silenced (Sh-CLEC12B) CLEC12B (Supplementary Figure 2A). After CLEC12B overexpression, we detected a specific 43-kDa band by western-blot analysis (Supplementary

Figure 2B). This was surprising because the theoretical molecular weight of CLEC12B is approximately 32 kDa. We thus performed a proteomic analysis, which confirmed that the upper 43-kDa band indeed corresponded to the CLEC12B protein (Supplemental Figure 2C). Treatment of the CLEC12B overexpressing-A375 melanoma cell line with tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation, showed a shift from 43 to 32 kDa. The observed 43-kDa band thus corresponded to an N-glycosylated form of CLEC12B (Supplemental Figure 2D). It was very difficult to assess the expression of CLEC12B in melanoma cells by western-blot analysis because the basal level of CLEC12B in A375 and MeWo melanoma cell lines was very low. Thus, CLEC12B gene silencing was confirmed by RT-qPCR analysis for all experiments. CLEC12B overexpression by lentiviral transduction inhibited cell proliferation by ~60% and, conversely, CLEC12B knockdown promoted proliferation of the A375 and MeWo human melanoma cell lines by 100% and ~60%, respectively (Figure 1D). We also assessed the impact of the modulation of CLEC12B levels on the ability of melanoma cells to form colonies. We observed ~45% fewer colonies in CLEC12B-overexpressing A375 and MeWo melanoma cells than those carrying the control vector (Figure 1E). The opposite effect was observed after CLEC12B silencing, showing ~100% more colony-forming units for A375 and ~60% for MeWo cells than those with control vector (Figures 1E). Overall, these results show that CLEC12B inhibits proliferation and colony formation in melanoma cell lines.

Hoffmann *et al.* showed that the inhibitory function of CLEC12B is mediated by the recruitment of the tyrosine phosphatases SHP1 and SHP2 to its ITIM domain upon receptor phosphorylation in human epithelial embryonic-kidney 293T cells (4). The recruitment and activation of SHP2 induces its own rapid dephosphorylation and, thus, after being activated, SHP2 becomes dephosphorylated (6). CLEC12B overexpression induced dephosphorylation of SHP2 (Y542) (Figure 2A) and pSHP^{Y542} levels were significantly higher in CLEC12B-silenced cells (Figure 2B). We further generated a point mutant of *CLEC12B* by exchanging

the ITIM tyrosine with phenylalanine (Ov-mut). Co-immunoprecipitation assays showed an interaction between CLEC12B and SHP2 in melanoma cells. Moreover, the recruitment of SHP2 no longer occurred when using the Ov-mut (Figure 2C). As expected, the effect on pSHP2^{Y542} observed after CLEC12B overexpression no longer occurred with the Ov-mut, either in A375 or MeWo cells (Figure 2D). Overexpression of CLEC12B with an altered ITIM domain had a significantly lower antiproliferative effect than overexpression of the wildtype form (Figure 2E). Overall, these data demonstrate that CLEC12B directly recruits and activates SHP2 through its ITIM domain in melanoma cells.

SHP2 plays a dual role in cancer, as it stimulates the MAPK pathway but also inhibits the STATs (7)(8)(9). The JAK/STAT signaling pathway plays a crucial role in melanoma and is generally constitutively activated during melanoma progression (10)(11). SHP2 appears to play a critical role in regulating the JAK/STAT pathway in cancer, particularly in melanoma (12)(13)(14)(15). We thus assessed whether modulating CLEC12B levels can affect the JAK/STAT pathway. STAT1, STAT3, and STAT5 phosphorylation was significantly lower in CLEC12B-overexpressing A375 cells than those carrying the control vector (Figure 3A). In contrast, Sh-mediated CLEC12B downmodulation promoted phosphorylation of STAT1, STAT3, and STAT5 (Figure 3A). We observed the same effects on the activation of STATs in MeWo cells (Supplementary Figure 3). SHP2 also appears to regulate the MAPK pathway (16)(17)(18), especially in melanoma cells not harboring mutations in BRAF or NRAS. However, we did not observe any modification of ERK or pERK when we modulated CLEC12B expression in A375 (BRAF^{V600E}, NRAS^{WT}) or MeWo cells (BRAF^{WT}, NRAS^{WT}) (Supplementary Figure 4). We further aimed to assess whether inhibition of the STATs was due to the recruitment of SHP2 by CLEC12B. Use of the altered-ITIM mutant of CLEC12B showed that the decrease of pSHP2 observed after CLEC12B overexpression was accompanied by lower phosphorylation of STAT3 (Figure 3B) and that these effects were lost

when the Ov-mut was expressed. Overall, our results indicate that the recruitment of SHP2 by CLEC12B may activate SHP2, which in turn leads to the dephosphorylation of STATs and lower proliferative capacity of the cells. We studied the role of CLEC12B in the cell cycle to better understand the mechanisms involved in its regulation of melanoma-cell proliferation. The percentage of cells in the G0-G1 phase of the cell cycle increased significantly in CLEC12B-overexpressing A375 cells (Figure 3C). In contrast, the percentage of cells in S phase decreased significantly in CLEC12B-silenced cells (Figure 3C). Moreover, the modulation of CLEC12B expression did not significantly modify the number of cells in the SubG1 phase, showing that the observed effects were not due to apoptotic cell death. In accordance with these results, western-blot analysis showed elevated levels of p21, p27, and p53 in CLEC12B-overexpressing A375 cells (Figure 3D). Conversely, the level of these proteins was reduced when CLEC12B was knocked down (Figure 3D).

Finally, we analyzed the tumorigenic properties of *CLEC12B* in Swiss nude mice. Tumor size was monitored for 36 days after inoculation of A375 cell lines transduced with an empty vector (EV), a CLEC12B-overexpressing vector (Ov-CLEC12B), or a silencing vector (Sh-CLEC12B). In accordance with *in vitro* results, tumor growth and volume in the CLEC12B group were significantly lower than in the vehicle control group (EV) and the opposite was true for Sh-CLEC12B compared to the corresponding EV' (Figure 4A,B). Immunofluorescence analyses of the tumor samples showed that CLEC12B lowered the level of pSTAT3 *in vivo* (Figure 4C, Supplementary Figure 5). Western-blot analysis of the protein extracted from the tumors confirmed that CLEC12B overexpression decreased pSTAT3 and increased p53 levels (Figure 4E), whereas the opposite was true after silencing of CLEC12B (Figure 4D,F).

STATs mediate essential signaling pathways and may be involved in many cancers (19)(20). Among the STATs, STAT3 appears to be of critical importance in several solid

cancers, including melanoma (21)(23)(24)(25). SHP2 is the main inhibitor of STAT3 by inducing its dephosphorylation (13)(26)(27). CLEC12B appears to be of great interest in counteracting melanoma by recruiting SHP2 and acting downstream on STATs, notably pSTAT3. Although data on the oncogenic role of STAT3 are unambiguous, the role of SHP2 in cancer remains controversial, showing both oncogenic and tumor suppressive properties (13)(15)(26)(28). Most of the beneficial effects of SHP2 have been associated with its regulation of STATs. *PTPN11*, which encodes SHP2, has been reported as an oncogene through its activation of the MAPK pathway in BRAF wildtype melanomas (29). Furthermore, SHP2 inhibitors have been reported to reduce tumor growth in a xenografted mouse model of melanoma by preventing MAPK activation (9). However, *PTPN11* shows either tumor-promoting or suppressing roles, depending on the context (8). Thus, in hepatocarcinoma, SHP2 acts as a tumor suppressor gene by inhibiting the activation of STAT3 (27). We observed no modification of ERK or pERK levels when CLEC12B was overexpressed or downregulated in melanoma cells. Importantly, CLEC12B induced transient activation of SHP2, which rapidly dephosphorylated itself, as previously reported (6). Most *PTPN11* mutations in melanoma are missense mutations clustered in the interacting portions of the amino N-SH2 and phosphotyrosine phosphatase domains, leading to a constitutively active conformation (30). It is possible that in melanoma, in which the MAPK pathway is highly modulated by many proteins, transient activation of SHP2 by CLEC12B may not itself affect activation of the MAPK pathway. On the other hand, phosphatases, particularly SHP2, are the main endogenous regulators of STAT3 activation.

Overall, we show that the recruitment of SHP2 by CLEC12B through its ITIM domain strongly decreases STAT activation (mostly STAT3), *in vitro* and *in vivo*, thus leading to a marked decreased in tumor growth. Thus, CLEC12B is a novel tumor-suppressive gene that

provides a potential marker for melanoma progression and prognosis and may be a new therapeutic target in the fight against deadly cancers, such as melanoma.

METHODS

Animal care and use for this study were performed in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals. Experimental procedures were specifically approved by the ethics committee of the Institut Curie CEEA-IC #118 (CEEA-IC 2016-001) in compliance with international guidelines.

Additional methods are provided in the Supplementary Methods.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Author contributions

HM conceived and performed the experiments. TP and LL supervised the work and conceptualized the experiments. HM, TP, and LL analyzed data. HM and TP wrote the manuscript. LS was helped performing the lentivirus production, and performed the co-immunoprecipitation assays. MH helped with western-blot analyses. BDM and NCL performed and interpreted the immunohistochemical analyses. GB helped to perform Quantitative real-time PCR and to collect patient samples. ASG and DD performed the proteomic analyses. YC helped with FACS analyses. VP was involved in *in vivo* experiments. FG performed the mutagenesis of CLEC12B and helped producing lentivirus-transduced cell lines. FG, MKT, BDM, and SR provided expertise and feedback on experiments and manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We sincerely thank, Sophie Leboucher (Institut Curie, Centre de Recherche, Plateforme d'Histologie, Orsay F-91405, France) for her help with immunofluorescence staining, Charlène Lasli (Institut Curie, Plateforme Cytométrie, Orsay, France) for her help with cytometry analysis, and Sandrine Destree and Arnaud Borderie for their help with immunohistochemical analysis. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and grants from the French Society of Dermatology (SFD) and the "Collège des Enseignants en Dermatologie de France" (CEDEF).

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer, INCa, ITMO Cancer, Fondation ARC (PGA) and is under the program «Investissements d'Avenir» launched by the French

Government and implemented by ANR Labex CeITisPhyBio (ANR-11-LABX-0038 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

REFERENCES

1. Ascierto PA et al. Perspectives in melanoma: Meeting report from the Melanoma Bridge (30 November-2 December, 2017, Naples, Italy). *J Transl Med* 2018;16(1):207.
2. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(8):463–482.
3. Regazzetti C et al. Transcriptional Analysis of Vitiligo Skin Reveals the Alteration of WNT Pathway: A Promising Target for Repigmenting Vitiligo Patients. *J. Invest. Dermatol.* 2015;135(12):3105–3114.
4. Hoffmann SC et al. Identification of CLEC12B, an inhibitory receptor on myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 2007;282(31):22370–22375.
5. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015;161(7):1681–1696.
6. Stein-Gerlach M, Kharitononkov A, Vogel W, Ali S, Ullrich A. Protein-tyrosine phosphatase 1D modulates its own state of tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1995;270(42):24635–24637.
7. Tajan M, de Rocca Serra A, Valet P, Edouard T, Yart A. SHP2 sails from physiology to pathology. *Eur J Med Genet* 2015;58(10):509–525.

8. Li S, Hsu DD, Wang H, Feng G-S. Dual faces of SH2-containing protein-tyrosine phosphatase Shp2/PTPN11 in tumorigenesis. *Front Med* 2012;6(3):275–279.
9. Zhang R-Y et al. SHP2 phosphatase as a novel therapeutic target for melanoma treatment. *Oncotarget* 2016;7(45):73817–73829.
10. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br. J. Cancer* 2015;113(3):365–371.
11. Basu R, Wu S, Kopchick JJ. Targeting growth hormone receptor in human melanoma cells attenuates tumor progression and epithelial mesenchymal transition via suppression of multiple oncogenic pathways. *Oncotarget* 2017;8(13):21579–21598.
12. Cai T et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. *Am J Cancer Res* 2015;5(5):1610–1620.
13. Kim M, Morales LD, Jang I-S, Cho Y-Y, Kim DJ. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci* 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092708
14. Xu D, Qu C-K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci.* 2008;13:4925–4932.

15. Frankson R et al. Therapeutic Targeting of Oncogenic Tyrosine Phosphatases. *Cancer Res.* 2017;77(21):5701–5705.
16. Zhou X-D, Agazie YM. Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(6):988–996.
17. Zhou X, Agazie YM. Molecular mechanism for SHP2 in promoting HER2-induced signaling and transformation. *J. Biol. Chem.* 2009;284(18):12226–12234.
18. Boschek CB et al. Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation. *Cell* 1981;24(1):175–184.
19. Heppler LN, Frank DA. Targeting Oncogenic Transcription Factors: Therapeutic Implications of Endogenous STAT Inhibitors. *Trends Cancer* 2017;3(12):816–827.
20. Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017;451:1–14.
21. Laudisi F, Cherubini F, Monteleone G, Stolfi C. STAT3 Interactors as Potential Therapeutic Targets for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* 2018;19(6). doi:10.3390/ijms19061787
22. Liu J et al. Pim-3 enhances melanoma cell migration and invasion by promoting STAT3 phosphorylation. *Cancer Biol. Ther.* 2018;19(3):160–168.

23. Fofaria NM, Srivastava SK. Critical role of STAT3 in melanoma metastasis through anoikis resistance. *Oncotarget* 2014;5(16):7051–7064.
24. Niu G et al. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 2002;21(46):7001–7010.
25. Xie T et al. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(6):3188–3196.
26. Qi C et al. Shp2 Inhibits Proliferation of Esophageal Squamous Cell Cancer via Dephosphorylation of Stat3. *Int J Mol Sci* 2017;18(1). doi:10.3390/ijms18010134
27. Bard-Chapeau EA et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Cell* 2011;19(5):629–639.
28. Zhang J, Zhang F, Niu R. Functions of Shp2 in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 2015;19(9):2075–2083.
29. Hill KS et al. PTPN11 Plays Oncogenic Roles and Is a Therapeutic Target for BRAF Wild-Type Melanomas. *Mol. Cancer Res.* 2019;17(2):583–593.
30. Tartaglia M et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 2001;29(4):465–468.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CLEC12B modulation shows clinical significance in melanoma and its overexpression inhibits proliferation and colony formation in melanoma cell lines.

(A) *CLEC12B* mRNA levels in human melanoma samples (A375, MeWo, Mel501, WM9, and Skmel28), cells extracted from three patients with metastases (1,2,3), and normal human melanocytes (NHM). Data are shown as the mean \pm SD. Scale bars=200 μ m. (B) Immunohistochemical analysis of CLEC12B: representative nevi samples (B1-B3), primitive thin melanomas (B4-B6), thick melanomas (B7-B9), melanoma metastases (B10-B15). B: Breslow thickness, LN: lymph node; *tumor cells. (C) Kaplan-Meier survival curves for CLEC12B “high” tumors (n=321, red curve) versus CLEC12B “low” tumors (n=137, blue curve). Data were extracted from the Tumor Cancer Genome Atlas database (n=458 samples from primary and metastatic melanoma). Significance defined as *p<0.05, **p<0.01. (D) Effect of CLEC12B overexpression (Ov) or silencing (Sh) on the proliferation of A375 and MeWo cells. (E) Effect of CLEC12B overexpression (Ov) or silencing (Sh) on colony formation of A375 and MeWo cells. The human melanoma cell lines A375 and MeWo were transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or its control (empty vector/EV) or silencing CLEC12B (Sh) or its control (empty vector’/EV’). For each experiment, the number of cells (D) and number of colonies (E) are expressed as the percent of vector alone (100%). Data are shown as the mean \pm S.D of three experiments performed in triplicate. Significantly different from the corresponding control: *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

Figure 2. CLEC12B recruits and activates the phosphatase SHP2 in melanoma cells through its ITIM domain. Western-blot analysis showing the effect of **(A)** CLEC12B overexpression (Ov) on the phosphorylation status of SHP2 (Y542) in A375 and MeWo cell lines and **(B)** CLEC12B knockdown (Sh) on the phosphorylation status of SHP2 (Y542) in A375 and MeWo cell lines. **(C)** Co-immunoprecipitation assay of the A375 human melanoma cell line. **(D)** Western-blot analysis showing the effect of Ov-mut on the phosphorylation status of SH2 in CLEC12B-overexpressing A375 and MeWo cells. **(E)** Effect of Ov-mut on the proliferation of CLEC12B-overexpressing A375 and MeWo cells. Human melanoma cell lines A375 and MeWo were transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or its control (empty vector/EV) or silencing CLEC12B (Sh) or its control (empty vector'/EV') and protein lysates (from A375 and MeWo cells) analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. Silencing of CLEC12B was confirmed by qRT-PCR as presented here (histograms). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Figure 3. CLEC12B inhibits the activation of STAT1, STAT3, and STAT5 and increases the expression of p21/p53 and p27. **(A)** CLEC12B overexpression (**left panel**) or knockdown (**right panel**) on the phosphorylation status of STAT1, STAT3, and STAT5 in A375 cells. **(B)** Western-blot analysis of the effect of overexpression of the ITIM mutant of CLEC12B (Ov-mut) on STAT3 phosphorylation. **(C)** Flow cytometry analysis of CLEC12B-overexpressing (**upper panels**, histograms **on the right** correspond to the mean of three independent experiments) or silenced (**lower panels**, histograms **on the left** correspond to the mean of three independent experiments) A375 cells with BrdU incorporation after cell-cycle synchronization. * $P = 0.02$, ** $P = 0.002$. **(D)** Effect of CLEC12B overexpression (**left panel**) or knockdown (**right panel**) on p53, p21, and p27 protein expression. A375 and MeWo cells

were transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or its control (empty vector/EV), and silencing CLEC12B (Sh) or its control (empty vector'/EV') and protein lysates (from A375 and MeWo cells) analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. Silencing of CLEC12B was confirmed by qRT-PCR as presented here (histograms). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

Figure 4. CLEC12B inhibits A375 melanoma-cell xenograft tumor growth *in vivo* and decreases the level of pSTAT3. A total of 4×10^6 cells (100 μ L) were subcutaneously engrafted into the flank of Swiss nude mice and tumor growth measured. Tumor volume of **(A)** Ov-CLEC12B (Ov) compared to empty vector (EV) and **(B)** Sh-CLEC12B (Sh) compared to empty vector' (EV'). Immunofluorescence analyses of pSTAT3 of tumor samples **(C)** Ov-CLEC12B (Ov) compared to empty vector (EV) and **(D)** Sh-CLEC12B (Sh) compared to empty vector' (EV'). Scale bars=200 μ m. Western-blot analyses of STAT3 and p53 performed with proteins extracted from A375 tumor samples **(E)** Ov-CLEC12B (Ov) compared to empty vector (EV) and **(F)** Sh-CLEC12B (Sh) compared to empty vector' (EV'). The human melanoma cell line A375 was transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or its control (empty vector/EV) or silencing CLEC12B (Sh) or its control (empty vector'/EV') and protein lysates analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. Silencing of CLEC12B was confirmed by qRT-PCR as presented here (histograms). *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

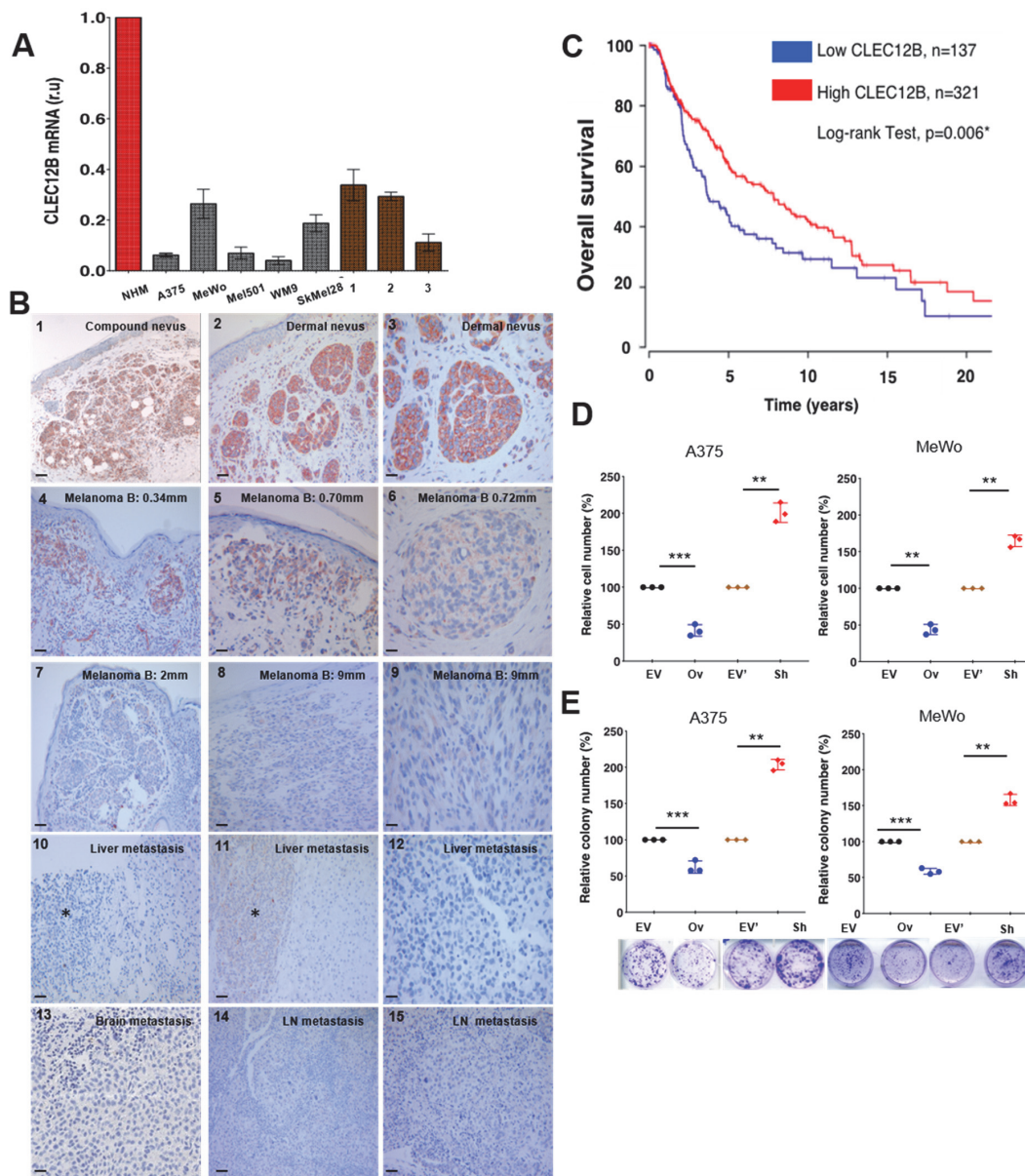


Figure 1. CLEC12B modulation shows clinical significance in melanoma and its overexpression inhibits proliferation and colony formation in melanoma cell lines.

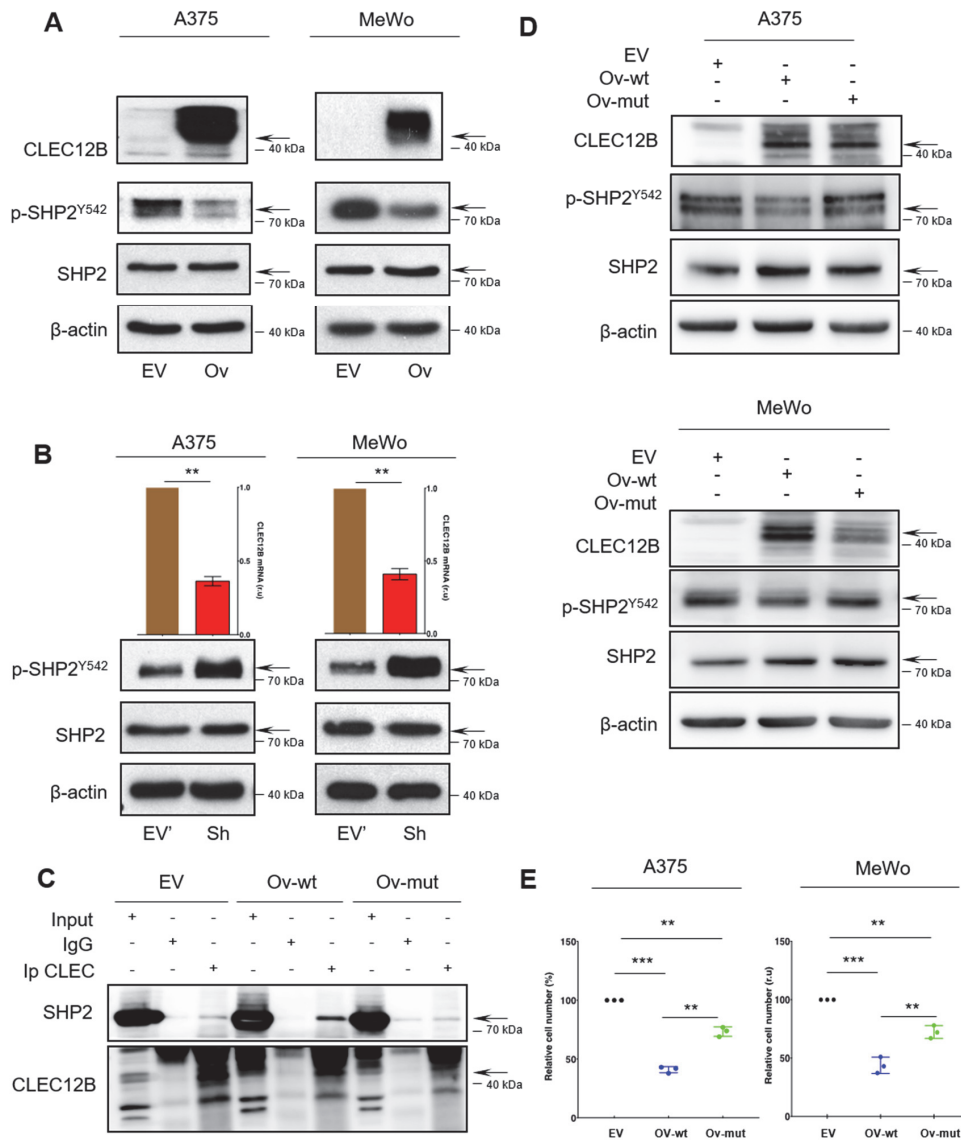


Figure 2. CLEC12B recruits and activates the phosphatase SHP-2 in melanoma cells, through its ITIM domain.

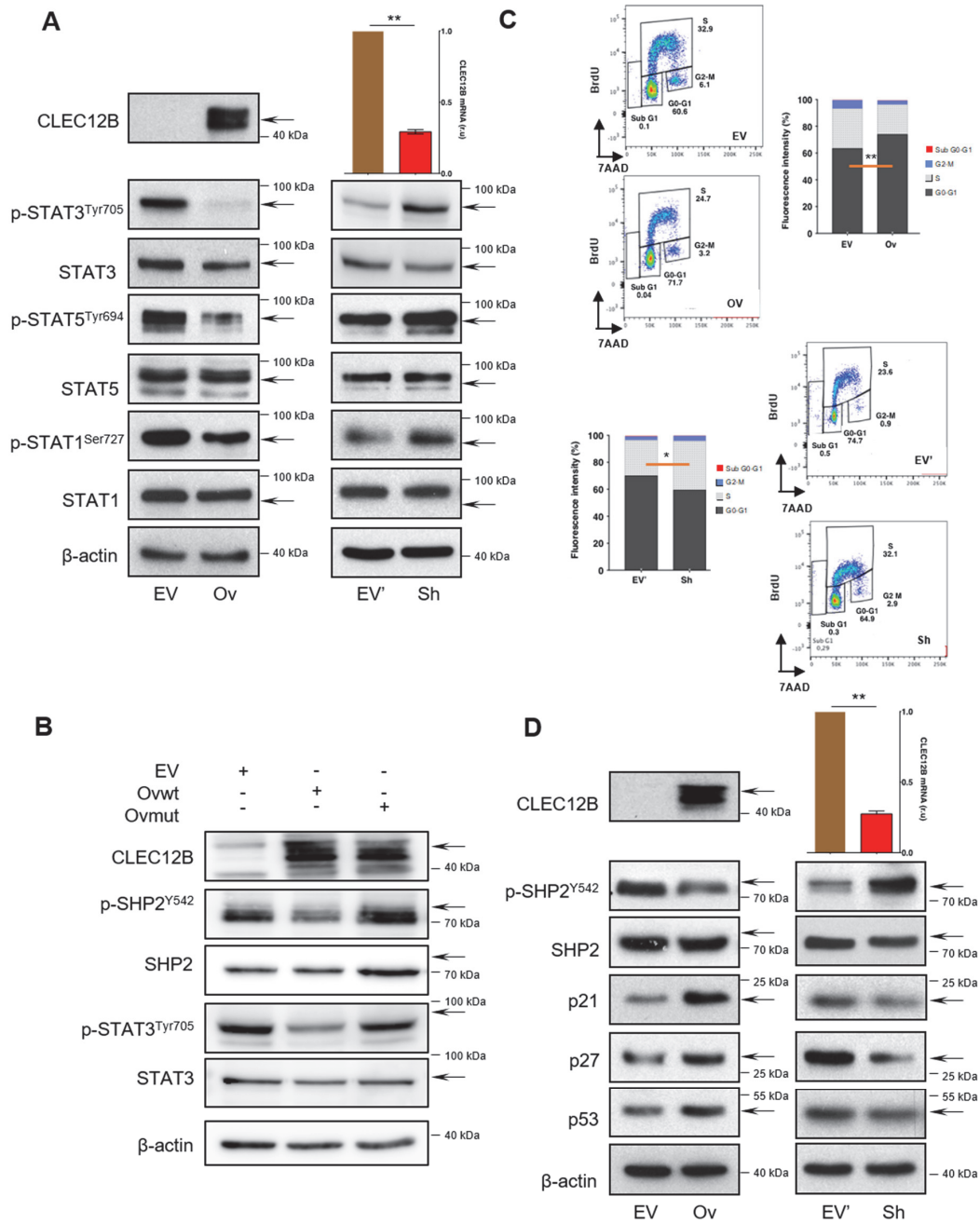


Figure 3. CLEC12B inhibits the activation of STAT1, STAT3 and STAT5 and increases the expression of p21/p53 and p27.

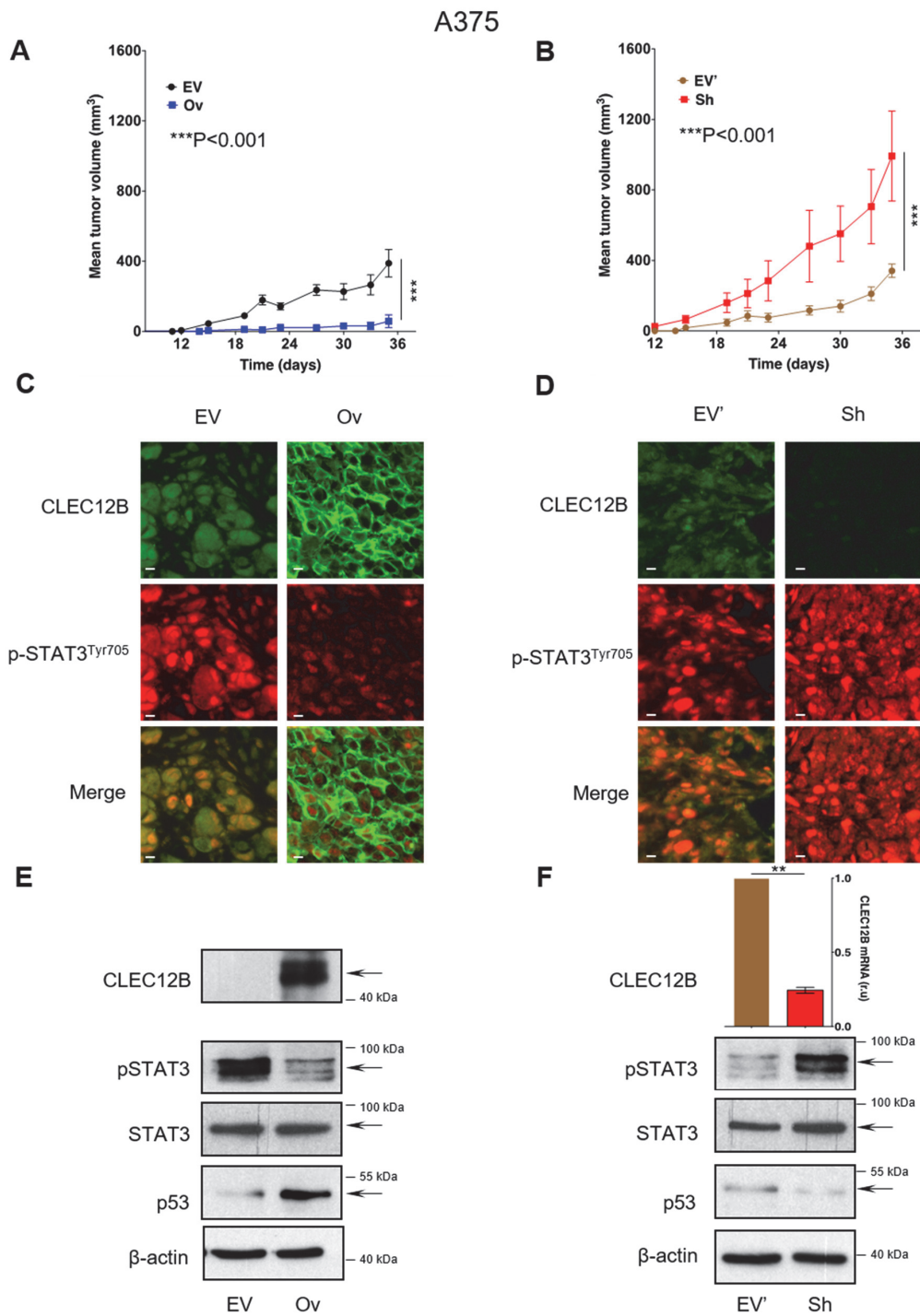


Figure 4. CLEC12B inhibits A375 melanoma cells xenograft tumor growth *in vivo* and represses the level of pSTAT3.

***CLEC12B* is a tumor suppressor gene in melanoma which regulates STAT activation**

Henri Montaudie^{1,2}, Laura Sormani¹, Bérengère Dadone-Montaudie^{3,4}, Marjorie Heim¹, Nathalie Cardot-Leccia³, Meri K Tulic¹, Guillaume Beranger¹, Anne-Sophie Gay⁵, Delphine Debayle⁵, Yann Cheli⁶, Valérie Petit⁷⁻⁹, Stéphane Rocchi¹, Franck Gesbert⁷⁻⁹, Lionel Larue^{7-9*}, and Thierry Passeron^{1,2*}

SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

Supplementary Table 1A. Genetic background of the cells used. wt: wild type, +: positive for the mutation.

Supplementary Table 1B. CLEC12B immunostaining of human nevus, thin melanoma, thick melanoma, and metastases slides of the 44 human samples analyzed. The cases illustrated in Figure 1B are shown in bold. 0: no staining, +: weak staining, ++: moderate staining, +++: strong staining.

Supplementary Figure 2A. Validation of the plasmids produced to overexpress or silence CLEC12B

Overexpression increased the mRNA levels of *CLEC12B* by approximately 150% and silencing decreased mRNA levels by approximately 70% in **(A)** A375 and **(B)** MeWo melanoma cell lines. Results are shown as the mean \pm SD and came from three independent experiments. Differences were significant when $P < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Supplementary Figure 2B. CLEC12B overexpression results in a 43-kDa band

The 43-kDa band is indicated by a black arrow. The human melanoma cell line A375 was transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or control (empty vector/EV) and protein lysates analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. EV: Empty Vector, Ov: Ov-CLEC12B.

Supplementary Figure 2C. The upper band observed at 43 kDa in western blots is CLEC12B

Mass spectrometry analysis of proteins (100 µg were deposited) contained in gel slices were treated with DTT/IAA and digested with trypsin. Extracted peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS. Data reprocessing was performed using Protein Discoverer 2.2 against the reviewed human database (Human_reviewed_180910). MW: molecular weight, NA: not applicable, ND: not detected.

Supplementary Figure 2D. Overexpression of CLEC12B induces its N-glycosylation

The human melanoma cell line A375 was transfected with a puromycin-resistance vector and a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov), then treated with 50 nM or 500 nM tunicamycin for 24 or 48 hours and protein lysates analyzed by western blotting. Western-blot analysis shows that the molecular weight of untreated CLEC12B is 43 kDa (black arrow) and decreases to 32 kDa (black arrow) after inhibition of glycosylation by tunicamycin treatment. GAPDH was used as the loading control.

Supplementary Figure 3. CLEC12B inhibits the activation of STAT1, STAT3, and STAT5 in MeWo cells

Western-blot analysis shows that CLEC12B overexpression promotes dephosphorylation of STAT1, STAT3, and STAT5 in the MeWo cell line (**left panel**), whereas its knockdown (**right panel**) promotes phosphorylation of these same proteins. The human melanoma cell line MeWo was transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or its control (empty vector/EV) or silencing CLEC12B (Sh) or its control (empty vector'/EV') and protein lysates (from A375 and MeWo cells) analyzed by western

blotting. β -actin was used as the loading control. Silencing of CLEC12B was confirmed by qRT-PCR as presented here (histograms), * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Supplementary Figure 4. Modulation of CLEC12B levels does not affect the MAP kinase/ERK signaling pathway

CLEC12B overexpression does not induce dephosphorylation of pERK in either A375 (**upper left panel**) or MeWo cells (**lower left panel**). Silencing of CLEC12B does not induce phosphorylation of ERK in either A375 (**upper right panel**) or MeWo cells (**lower left right**). The human melanoma cell lines A375 and MeWo were transfected with a puromycin-resistance vector and either a lentivirus overexpressing CLEC12B (Ov) or its control (empty vector/EV) or silencing CLEC12B (Sh) or its control (empty vector'/EV') and protein lysates (from A375 and MeWo cells) analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. Silencing of CLEC12B was confirmed by qRT-PCR as presented here (histograms), * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Supplementary Figure 5. Cells surrounding CLEC12B-positive cells are fibroblastic-like

Immunofluorescence analyses of tumor samples, showing that **(A)** tumoral cells (A375 melanoma cells) with low levels of CLEC12B (green staining, corresponding to EV condition) are positive for pSTAT3 (red staining), **(B)** those which overexpress CLEC12B (Ov) are negative for pSTAT3, and **(C)** peri-tumoral cells which are negative for CLEC12B express pSTAT3 (red staining). **(D)** Non-melanoma cells (SOX10 (-), red staining). Scale bars=200 μ m.

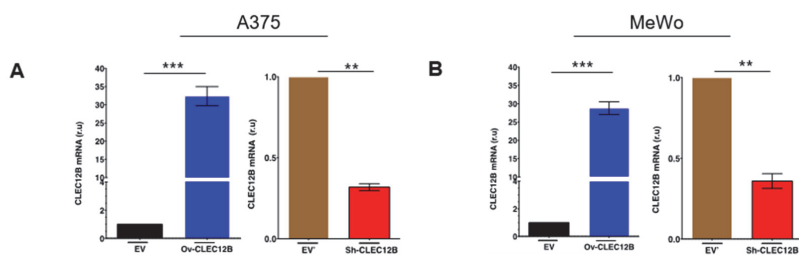
Supplementary 1A: Genetic background of the cells used.

Cell line	Sex	NRASQ61K	NRASQ61L	NRASQ61R	BRAFV600E	CDKN2A
MeI501	male	wt	wt	wt	+	Deletion of exon 1a
A375	female	wt	wt	wt	+	wt
MeWo	male	wt	wt	wt	wt	Deletion of exon 2
SKmel28	male	wt	wt	wt	+	wt
WM9	male	wt	+	wt	+	wt
Patient 1 (metastasis from lymph node)	male	wt	wt	wt	wt	wt
Patient 2 (metastasis from skin)	female	wt	wt	wt	wt	wt
Patient 3 (metastasis from lymph node)	female	wt	wt	wt	+	wt

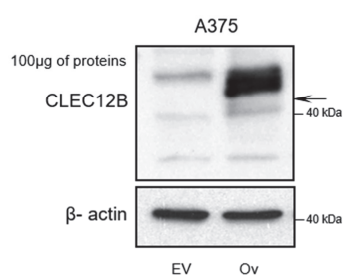
Supplementary 1B: CLEC12B immunostaining of human nevus, thin melanoma, thick melanoma and metastases slides in forty-four human samples analyzed

Histology	Percentage of positive tumor cells for CLEC12B	Immunostaining intensity for CLEC12B
Benign lesions = nevi (n=12)		
Dermal nevus	100	++
Junctional nevus	100	++
Congenital nevus	100	++
Dermal nevus	100	+++
Dermal nevus (Figures B2 and B3)	100	+++
Dermal nevus	90	++
Compound nevus	100	+++
Dermal nevus	100	+++
Dermal nevus	100	++
Compound nevus	100	+++
Dermal nevus	100	+++
Compound nevus (Figure B1)	100	+++
Thin melanomas (Breslow thickness <1.5mm) (n=11)		
Non invasive melanoma	100	+++
SSM (B: 0.35mm)	100	++
Sptizoid melanoma (B: 0.60mm)	100	++
SSM (B: 0.35mm)	90	++ to +++
SSM (B: 0.34mm) (Figure B4)	100	+++
SSM (B: 0.90mm)	100	+++
SSM (B: 0.30mm)	100	+++
SSM (B: 0.70mm)	100	+ to ++
SSM (B: 0.70mm) (Figure B5)	90	+++
SSM (B: 0.72mm) (Figure B6)	100	+
SSM (B: 1.25mm)	100	+++
Thick melanomas (Breslow thickness >1.5mm) (n=9)		
Nodular (B: 9mm)	70	+
SSM (B: 4mm)	70	+
SSM (B: 2mm) (Figure B7)	60	+
Nodular (B: 9mm) (Figure B8)	20	+
Nodular (B: 9mm) (Figure B9)	30	+
SSM (B: 8mm)	20	++
Nodular (B: 12mm)	60	+
SSM (B: 1.8mm)	80	+
Nodular (B > 10mm)	10	+
Metastases (n=12)		
Brain metastasis	100	+ to +++
LN metastasis (Figure B15)	20	++ to +++
LN metastasis (Figure B14)	10	+
Brain metastasis (Figure B13)	<10	++
LN metastasis	<5	+
Gut metastasis	<5	+
Brain metastasis	<5	+
Liver metastasis (Figures B10-B12)	0	0
Liver metastasis (Figure B11)	<10	+
Cutaneous metastasis	0	0
Gut metastasis	0	0
Gallbladder metastasis	0	0

Supplementary 2A. Validation of the plasmids that we produced to overexpress and silencing CLEC12B.



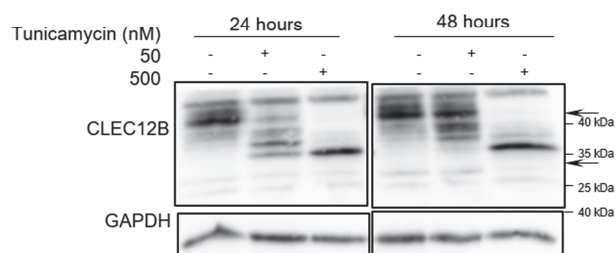
Supplementary 2B. CLEC12B overexpression reveals a band at 43 kilo Dalton (kDa, black arrow).



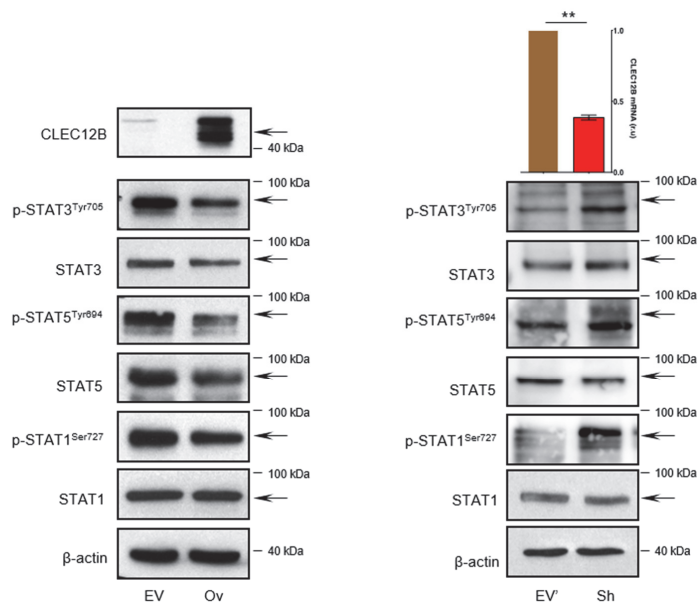
Supplementary 2C. The upper band observed at 43 kilo Dalton in western blot is CLEC12B.

Analyzed band size	Mass spectrometry analysis	A375 EV	A375 Ov-CLEC12B
25 - 35 kDa	Number of proteins	435	NA
	CLEC12B identification	ND	NA
40 kDa	Number of proteins	2,522	2,631
	CLEC12B identification	ND	5 unique peptides identified

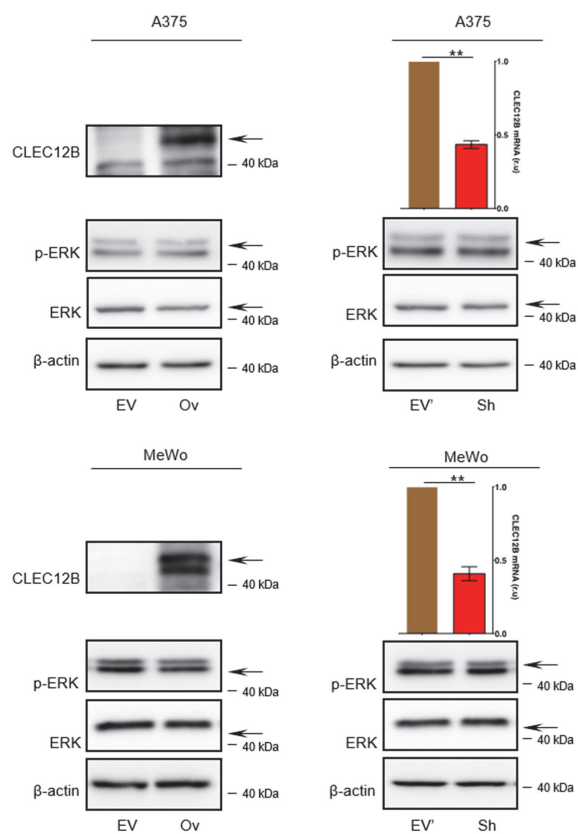
Supplementary 2D. Overexpression of CLEC12B induces its N-glycosylation.



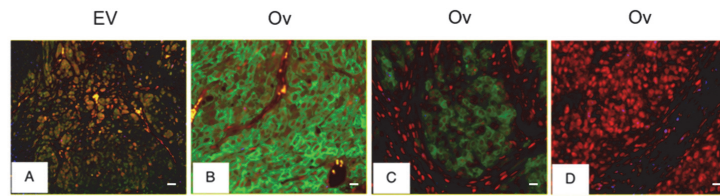
Supplementary 3. CLEC12B inhibits the activation of STAT-1, 3 and 5 in MeWo cells.



Supplementary 4. CLEC12B modulation does not impact MAP kinase/ERK signalling pathway.



Supplementary 5 . Surrounding CLEC12B positive cells are fibroblastic-like cells.



SUPPLEMENTARY METHODS

Quantitative real-time PCR

Cell pellets were harvested, the RNA extracted (using RNeasy kits, Qiagen), and 1 µg RNA used to synthesize cDNA, using the Reverse Transcription System (Promega), which was then used as a template for amplification by real-time qPCR with SybrTM Green reagent (Life Technologies, CA, USA) and specific primers directed against the CLEC12B gene. All measurements were performed in triplicate and the results were normalized to the expression of the SB34 housekeeping gene.

CLEC12B forward: 5'-TGA GGA GAA AAC CTG GGC TA-3'

CLEC12B reverse: 5'-GCC AGA GGA GTC CCA TGA TA-3'

SB34 forward: 5'-TGC ATC AGT ACC CCA TTC TAT CA-3'

SB34 reverse: 5'-AAG GTG TAA TCC GTC TCC ACA GA-3'

Immunohistochemical analysis

In total, 44 cases of melanocytic tumor were retrospectively collected (Department of Dermatology and Pathology, Archet and Pasteur Hospitals, CHU Nice): n = 12 benign melanocytic lesions, n = 11 primitive melanoma, with a Breslow thickness < 1.5 mm, n = 9 primitive melanoma, with a Breslow thickness > 1.5 mm, and 12 metastases from melanoma. Immunohistochemistry was performed from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections using the Agilent Dako Autostainer Link 48 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) with an antibody against CLEC12B (clone LS-B11313, 1/100, pH9, LS-Bio, Seattle, WA), according to standard procedures. Interpretation was performed blindly by two independent pathologists (BDM, NCL) based on two parameters: the percentage of positive (stained with

the AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) chromogen) tumor cells and the staining intensity (0: no staining, +: weak staining, ++: moderate staining, and +++: strong staining).

Cell lines – cell culture

The human melanoma cell lines A375 (CRL-1619) and MeWo (#HTB-65) were purchased from the American Tissue Culture Collection (Molsheim, France). Both A375 and MeWo were cultured at 37°C in 5% CO₂ and grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (100 IU, 50 µg.mL⁻¹).

Normal human melanocytes (NHMs) were obtained from the foreskin of young children (skin type based on the experimental question) undergoing circumcision. Tissue samples were kindly supplied by the Department of Pediatric Surgery, Lénval Hospital (Dr. Kurzenne, Nice, France). The samples were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% Antibiotic/Antimycotic (Gibco, Life Technologies, USA) three times for 5 min each. After removal of the subcutaneous tissue, the rest was cut into 2 × 2 mm² pieces.

The foreskin samples were incubated in dispase enzyme (4 U.mL⁻¹, Roche) for 12 to 16 h at 4°C. After separating the dermis and epidermis of the foreskins with forceps, the epidermis was incubated in a trypsin/EDTA solution for 20 min at 37°C and the cells dispersed into suspensions and filtered with a cell strainer (70 µm, Falcon) before a final wash with PBS.

NHMs were isolated in MCDB 153 medium (Sigma Aldrich) supplemented with 2% FBS (SV30160-03, Hyclone, USA), 5 µg.mL⁻¹ insulin (Sigma Aldrich), 0.5 µg.mL⁻¹ hydrocortisone (Sigma Aldrich), 16 nM TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma Aldrich), 1 ng.mL⁻¹ basic fibroblast growth factor (Promega), 15 µg.mL⁻¹ bovine pituitary extract (Gibco, Life Technologies), 10 µM forskolin (Sigma Aldrich), and 20 µg.mL⁻¹ geneticin (Invitrogen) over two weeks or until we obtained a pure melanocyte population. Melanocytes between passages

2 and 6 were used. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Patient melanoma cells were obtained from surgical waste from patients diagnosed with metastatic melanoma at the Nice CHU hospital. Written informed consent was obtained from each patient included in this study and the study was approved by the hospital ethics committee (Nice Hospital Center and University of Nice Sophia Antipolis, no. 210-2998). Briefly, biopsies were dissected and digested for 1 to 2 h with Collagenase A (0.33 U.mL⁻¹), Dispase (0.85 U.mL⁻¹), and DNase I (144 U.mL⁻¹) at 37°C. Large debris was removed by filtration through a 70-µm cell strainer. Cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin (100 U.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹) at 37°C and 5% CO₂.

Proteomic analysis

For mass spectrometry analysis, protein contained in gel slices was reduced/alkylated and digested by treatment with DTT/IAA and trypsin. Extracted peptides were separated using a nanoHPLC (Ultimate 3000, ThermoFisherScientific). Peptide separation was performed on a 75-µm i.d. × 250 mm (3 µm, 100 Å) Acclaim PepMap 100 C18 column (ThermoFisher Scientific) at a flow rate of 300 nL.min⁻¹. The solvent system was: (A) 100% water/0.1% FA and (B) 100% acetonitrile/0.08% FA. The following gradient was used t = 0 min: 6% B, t = 3 min: 6% B, t = 119 min: 45% B, t = 120 min: 90% B, t = 130 min: 90% B (at 35°C). The nanoHPLC was coupled to a Q-exactive *plus* mass spectrometer (ThermoFisherScientific). MS spectra were acquired at a resolution of 70,000 (200 m/z) in a mass range of 300–2000 m/z with an AGC target value of 3 × 10⁶ and a maximum injection time of 100 ms. The 10 most intense precursor ions were selected and isolated with a window of 2 m/z and fragmented by HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) with a normalized collision energy (NCE) of 27. MS/MS spectra were acquired in the ion trap with an AGC target value of 2 × 10⁵, the resolution was set at 17,500 at 200 m/z combined with an injection time of 100 ms. Data were reprocessed

using Proteome Discoverer 2.1 equipped with Sequest HT. Files were searched against the Swissprot Homo sapiens FASTA database (update of September 2018). A mass accuracy of ± 10 ppm was used for precursor ions and 0.02 Da for product ions. Enzyme specificity was fixed to trypsin, allowing a maximum of two mis-cleavages. Because of the previous chemical modifications, carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification and only oxidation of methionine was considered as a dynamic modification. Reverse decoy databases were included for all searches to estimate false discovery rates and filtered using the Percolator algorithm at a 1% FDR.

Lentivirus production and transduction

Lentivirus production and transduction self-inactivating HIV-1-derived vectors were generated by transient transfection of HEK 293T cells as previously described. Viral vectors pseudo-typed with VSV-G were produced. Transfection was performed using the classical calcium-phosphate method. For VSV-G-LV preparation, 3 μ g of phCMV-VSVG plasmid was co-transfected with a Gag-Pol packaging plasmid (PAX2) and a plasmid encoding a self-inactivating LV. For the overexpression of CLEC12B, we used a customized CLEC12B Lentiviral Vector pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro (Cat No LV796325, Applied Biological Materials, CDS of CLEC12B: accession Number NM_001129998 - transcript variant 1) and the control plasmid Blank Vector pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (LV590).

For the silencing of CLEC12B, we used MISSION shRNA plasmid DNA (Sigma Aldrich):

- NM_205852 / TRCN0000164269 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP
- NM_205852 / TRCN0000163794 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP
- NM_205852 / TRCN0000160830 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP
- NM_205852 / TRCN0000159325 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP

- NM_205852 / TRCN0000158674 / -HPGK-PURO-CMV-TGFP

The constructs with the best knockdown efficiency (tested using qPCR) were chosen for *in vitro* experiments. As a negative control, we used the MISSION Non-Target shRNA Control Vector (Sigma Aldrich, Catalog Number SHC002). Viral supernatant was harvested 48 h after transfection and filtered through a 0.45- μm cellulose acetate filter. Low-speed concentration of the vectors was performed by overnight centrifugation of the viral supernatant at 3,000 x g at 4°C. Serial dilutions of vector preparations were added to 293T cells to determine transduction efficiency and infectious titers of the HIV vectors. The infectious titers are expressed as 293T transducing units per milliliter ($\text{TU}\cdot\text{mL}^{-1}$). Human melanoma cells lines (A375 and MeWo) were serially passaged and used at passage 3 for viral infection. Cells were seeded in six-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and infected with a multiplicity of infection of 20. Cells were incubated with virus for 72 h. The infected cells were selected for stable expression using puromycin at $1\mu\text{g}/\text{mL}$. Infected A375 and MeWo cells were cultured at 37°C in 5% CO_2 and grown in RPMI medium supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (100 IU , $50\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Cell growth/proliferation assay

Cells were plated in six-well tissue-culture plates at a density of 20,000 cells per well for A375 melanoma cells and 60,000 for MeWo melanoma cells. Then, the cell number was determined using a Malassez chamber at 48 h for MeWo cells and 72 h for A375 cells.

Colony formation assay

Cells were plated in six-well tissue-culture plates at a density of 500 cells per well. After 12 days for A375 melanoma cells and 14 days for MeWo melanoma cells, colonies were fixed with 70% ethanol and stained with 2% crystal violet, washed with water to remove the excess dye, and imaged by a scanner. Quantitative changes in clonogenicity were determined by counting the colonies using Bio-Rad Vision-Capt software.

Western blotting, antibodies, and detection

Cells were grown in six-well tissue-culture plates for the time indicated in the corresponding figure. Whole-cell lysates were prepared from human melanoma cell lines using RIPA buffer supplemented with Complete inhibitor (Roche, #11873580001) and PhosStop (Roche, #04906837001), followed by centrifugation at 15,000 x g for 20 min at 4°C. Total protein in cell lysates was quantified. SDS-PAGE was carried out on homemade 10 or 12% polyacrylamide protein gels and the proteins transferred to membranes. Membranes were blocked in TBST (TBS; 20 mM Tris (Sigma: T-1503) pH 7.6), 150 mM NaCl (OSI, A 4321152) and 0.1% Tween-20 (VWR 8221840500) [v/v]) with 5% non-fat dry milk for 1 h at RT. They were then probed with antibodies against CLEC12B (Proteintech, #26077-1-AP), SHP2 (BD #610621), phospho-SHP2 (Tyr542, Cell Signaling, #3751), β -actin (Sigma, A5441), GAPDH (Santa Cruz #32233), HSP90 (Cell Signaling, #4874), STAT1 (Cell Signaling, #9172), phospho-STAT1 (Ser727, Cell signaling, #8826), STAT3 (BD, #610189) phospho-STAT3 (Tyr 705, BD, #612356), STAT5 (Cell signaling, #9363), phospho-STAT5 (Tyr694, Cell signaling, #9351), p53 (Santa Cruz, #126), p21 (Cell signaling, # 2946), p27 (Cell signaling, #2552), ERK (Santa Cruz, #514302), or phospho-ERK (Santa Cruz, #7383). Primary antibodies were applied in TBST/5% non-fat dry milk overnight at 4°C and visualized using secondary antibodies (HRP conjugated goat anti-rabbit IgG, Jackson, 111-035-003 or HRP conjugated goat anti-mouse IgG, Jackson, 115-035-003) in TBST/5% non-fat dry milk for 1 h at RT. Blots

were incubated in ECL (Pierce, #34075) and revealed in a dark room using ECL hyperfilm (GE Healthcare, RPN3103K). All primary antibodies were used at a dilution of 1/1,000 except β -actin (1/10,000) and phospho-STAT3 (1/5,000). All secondary antibodies were used at dilution of (1/20,000). The Pageruler molecular marker was used (ThermoFisher, #26616).

Co-Immunoprecipitation

After washing with PBS, cells were lysed in NP40 lysis buffer containing protease inhibitors (Roche), phosphatase inhibitors (Roche), and sodium orthovanadate (Cat# AK-102V-L, Jena Bioscience). The supernatant was collected, centrifuged at 13,000 x g for 10 min and assayed for protein concentration using the BCA kit (Pierce). Total protein (500 μ g) diluted in 500 μ l lysis buffer was incubated with 2 μ g CLEC12B antibody under agitation for 30 min at room temperature. After three washes with lysis buffer, magnetic beads (Ademtech Bio-Adembeads PAG 0463) were added to the cell lysates and the lysates incubated overnight at 4°C under agitation. The target protein was eluted (PAG elution buffer, Cat# 10701, Ademtech) and analyzed by western blotting.

Site-directed Mutagenesis of CLEC12B

The CLEC12B Y \rightarrow F mutation was generated by site-directed mutagenesis using the QuikChange II $\text{\textcircled{R}}$ XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Agilent Technologies, Les Ulis, France), according to the manufacturer's instructions. The following primers were used (the substituted nucleotides are shown in bold and underlined):

- CLEC12B Y \rightarrow F-forward: 5'-GTC TGA AGA AGT GAC CTTCGC GAC ACT CAC ATT TC-3'

- CLEC12B Y \rightarrow F-reverse: 5'-GAA ATG TGA GTG TCG CGAAGG TCA CTT CTT CAG AC-3'

Mutations were verified by DNA sequencing (MWG-Eurofins).

BrdU incorporation and FITC staining assay- flow cytometry analysis

A375 melanoma cells were seeded (complete medium: RPMI, 10% serum, 1% Penicillin-Streptomycin) at day 0 (D0) in six-well tissue-culture plates so as to reach 70 to 80% confluency by day 1 (D1). At D1, serum was removed, and the plates incubated a further 48 h to synchronize the cells (D1 to D3). At D3, complete medium was reintroduced, the cells incubated for 3 h, 10 mM BrdU (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States) added, and then the cells incubated an additional 1 h at 37°C. Cells were then rinsed, trypsinized, and fixed overnight (12 h) in cold 70% ethanol. At D4, after several wash cycles in wash buffer (TBS-0.5% BSA), cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in TBS with 5% BSA for 20 min. Then, cells were incubated in 2 M HCl for 20 min, rinsed twice (5 min) in wash buffer, resuspended for 2 min in 0.1M borate sodium, and rinsed once with wash buffer. Cells were incubated in anti-BrdU-FITC (10 µL of anti-BrdU-FITC per 5×10^5 cells) (clone 3D4, 556028, Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences) in wash buffer with 0.1% Triton X-100 for 45 min. After washing, the cells were stained with 7AAD (10 mg/mL) in 1X PBS with RNase A (10 mg/mL) for 20 min in the dark. Flow cytometry was performed using a BD FACSCanto cytometer (Becton Dickinson and Company, BD Biosciences). Bivariate analysis of FITC-BrdU content versus 7AAD-DNA content was performed using FlowJo software (FlowJo LLC).

***In vivo* experiments - tumor xenograft experiments**

Swiss nude mice were purchased from Charles River Laboratories. All mice were housed under pathogen-free conditions in the animal facility and received autoclaved water and food. Twenty-four nude mice were injected with A375 melanoma cells (6 mice per group; Ov-CLEC12B/vector and Sh CLEC12B/vector). Cells were resuspended in PBS and 4×10^6 cells (100 μ L) were subcutaneously implanted into the flank of nine-week-old Swiss nude mice using a 27-gauge needle. Tumor size was measured with calipers every three days and the volume (V) was determined by the equation $V = (L \times w \times h)\pi/6$, in which L is the length, w is the width, and h is the height of the tumor.

Immunofluorescence of tumor samples

Paraffin-embedded tumors were cut into 7- μ m-thick transverse sections. After dewaxing and rehydration, sections rinsed in TBST, boiled for 20 min in 10 mM sodium citrate, and blocked with TBST containing 3% BSA (Sigma A9418). Sections were incubated overnight at 4°C in TBST containing 3% BSA with antibodies against p-STAT3 (Cell signaling, #9131), CLEC12B (Proteintech, #26077-1-AP), or SOX-10 (Cell Signaling#89356S). Samples were then incubated in donkey anti-rabbit IgG (H&L), Affinity Pure DyLight® 488 (Diagomics, ref DkxRb-003-F488NHSX), and Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Life technologies - Thermo Fisher ref A-21207) secondary antibodies for 25 min at room temperature. All sections were mounted with Fluoroshield with DAPI mounting medium (Sigma, ref F6057). Images were taken using the ZEISS Axio Imager 2 with AxioCam 506 color cameras. Image analysis was performed using ZEISS ZEN, Adobe Photoshop, and ImageJ software.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 6 software.

For the clinical relevance study of CLEC12B in melanoma, the data were downloaded from the *TCGA* database and high-level expression of CLEC12B defined as one or more transcripts per million kilobases (TPM) and low-level expression as less than 1 TPM. Survival analysis was performed according to the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to determine significance.

For all cell-based assays and flow cytometry analyses, each experiment was repeated at least three times and representative results are shown in the figures. Mann Whitney non-parametric analysis was used to assess unpaired differences between two groups.

In xenograft tumor experiments, tumor volume at different time-points and final tumor weight were compared between Ov-CLEC12B or Sh-CLEC12B and the vehicle treated group. Statistical significance was evaluated using the Mann Whitney test.

A p-value < 0.05 was considered statistically significant for all statistical analyses. Statistical significance are represented in the figures as * (P < 0.05), ** (P < 0.001), or *** (P < 0.0001).

Software

GraphPad PRIZM version 6, Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, and Microsoft Power Point software were used for the generation of graphs and figures.

IV. DISCUSSION

Premier article (en révision dans Journal of Clinical Investigation)

CLEC12B : a new gene regulating the color of skin

Ce travail de thèse a permis la découverte d'un nouveau gène dans la pigmentation cutané: *CLEC12B* (*C-type lectin domain family 12 member B*).

Le défi majeur de ce projet a résidé dans le fait qu'il n'existe, encore à ce jour, que très peu de données sur ce gène dans la littérature scientifique. Depuis son identification, en 2007, comme étant un récepteur exprimé dans les cellules myéloïdes et agissant comme régulateur négatif de l'immunité via son interaction avec les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Hoffmann S. *et al.*, 2007), il n'a jamais fait l'objet d'autres études descriptives ou fonctionnelles. Selon les études d'association pangénomique référencées dans le catalogue GWAS (Genome Wide Association Study), aucun phénotype ni aucune pathologie n'ont été rapportés comme étant corrélés à ce gène. Son expression et son rôle dans d'autres types cellulaires n'ont jamais été étudiés. Ses ligands n'ont toujours pas été identifiés, ses partenaires d'interactions sont inconnus et les voies de signalisation qu'il régule n'ont pas été décrites.

Au travers d'analyses, d'abord descriptives puis fonctionnelles, ainsi que par l'étude des mécanismes moléculaires, nous aborderons ci-dessous les principales conclusions de notre travail, à savoir que :

- CLEC12B est exprimé par les mélanocytes ;
- L'expression de CLEC12B dans la peau normale est influencée par le phototype ;
- CLEC12B module la synthèse de mélanine dans les mélanocytes humains normaux en culture et dans un modèle d'épiderme reconstruit ;
- CLEC12B induit la dégradation protéasomale de CREB ;
- CLEC12B régule la mélanogenèse via le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2.

Étude descriptive de CLEC12B dans la peau humaine

CLEC12B : un CTLR exprimé par les mélanocytes

Ce projet de thèse a débuté avec une étude transcriptomique à large échelle réalisée sur des peaux lésionnelles de patients atteints de vitiligo (dépourvues de mélanocytes et donc de pigmentation) comparées à des peaux non lésionnelles et des peaux de sujets sains. L'analyse différentielle des transcrits a permis de mettre en évidence CLEC12B dont l'expression était significativement régulée négativement dans les peaux lésionnelles en comparaison avec les peaux non lésionnelles ou saines. Le degré de régulation de CLEC12B étant similaire à ceux observés pour les enzymes clés de la mélanogenèse comme TYR, DCT ou TYRP1, nous avons émis l'hypothèse que CLEC12B pouvait être un gène mélanocytaire important et jouer un rôle, jusqu'ici inconnu, dans la pigmentation cutanée.

Cette hypothèse a été vérifiée par la réalisation d'un immuno-marquage fluorescent de CLEC12B et de MITF sur des coupes histologiques de peaux saines montrant que CLEC12B était exprimé sélectivement dans les mélanocytes de l'épiderme. L'analyse comparative des transcrits de CLEC12B en qPCR dans les 3 principaux types cellulaires de la peau (mélanocytes, kératinocytes et fibroblastes humains normaux) montre une différence d'expression significative. L'expression de CLEC12B est environ 5 fois plus élevée dans les mélanocytes (MHN) par rapport aux kératinocytes (KHN) et 15 fois plus élevée par rapport aux fibroblastes (FHN). Il est important de préciser ici qu'un faible pourcentage de mélanocytes persiste, malgré la sélection, dans la population de kératinocytes humains normaux isolée à partir de peau issue de prépuce de jeunes enfants. La présence de MHN dans la population de KHN utilisée dans l'analyse qPCR peut expliquer une différence d'expression moins importante de CLEC12B entre ces 2 types cellulaires.

Afin de poursuivre la caractérisation de CLEC12B, nous avons étudié sa localisation subcellulaire dans des mélanocytes en culture. La séquence protéique de CLEC12B contient un domaine hydrophobe transmembranaire (acides aminés 43-64) qui suggère une localisation membranaire du récepteur à la surface de la cellule. Cependant, les marquages en immunofluorescence de CLEC12B dans les MHN montrent une localisation diffuse cytoplasmique. Afin de vérifier si l'anticorps anti-CLEC12B utilisé pour l'immuno-marquage était spécifique, nous avons infecté des MHN avec des particules lentivirales permettant l'expression d'une protéine CLEC12B fusionnée à la GFP (green fluorescent protein). Nous avons observé une colocalisation entre la GFP et l'anticorps anti-CLEC12B couplé à un anticorps secondaire fluorescent (AlexaFluor 594nm), validant ainsi la spécificité de l'anticorps. De manière intéressante, cette construction nous a également permis d'observer une localisation membranaire de CLEC12B dans les mélanocytes. Un

marquage immuno-gold en microscopie électronique ainsi qu'un fractionnement cellulaire ont été réalisés mais les contraintes techniques liées à l'anticorps utilisé lors de ces expériences n'ont pas permis l'obtention de résultats robustes. Cependant, la distribution cytoplasmique est également retrouvée dans le cas de CLEC1 qui, tout comme CLEC12B, est un récepteur de type lectine (CLR) appartenant au cluster de gènes Dectin-1 (Sattler S. *et al.*, 2011).

L'expression de CLEC12B dans la peau normale est influencée par le phototype

La couleur de la peau humaine est déterminée par des gènes qui contrôlent la pigmentation naturelle dite « constitutive ». À ce jour, on dénombre 378 *loci* impliqués dans la pigmentation (décrits chez la souris et leurs homologues chez l'homme et le poisson zèbre) lorsqu'ils sont mutés (<http://www.espcr.org/micemut>). Cependant, CLEC12B n'est, à ce jour, pas répertorié dans cette liste.

L'analyse comparative des transcrits de CLEC12B en qPCR dans des mélanocytes issus de peaux faiblement pigmentées (phototype I/II) et de peaux fortement pigmentées (phototype V/VI) a montré que l'expression de CLEC12B était significativement plus forte dans les mélanocytes extraits à partir des peaux claires. Nous avons confirmé ce résultat grâce à un marquage immunohistochimique de CLEC12B sur des peaux normales de phototype clair ou foncé.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que CLEC12B est une protéine spécifique des mélanocytes dans la peau humaine et que son expression est plus élevée dans les peaux faiblement pigmentées par rapport aux peaux fortement pigmentées.

Analyse fonctionnelle de CLEC12B

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux approches complémentaires pour étudier le rôle de CLEC12B dans la pigmentation : l'extinction de son expression par shRNA (short hairpin RNA) et la surexpression médiée par lentivirus. 3 séquences de shRNA différentes ont été testées. L'efficacité d'extinction et de surexpression ont été validées en qPCR.

L'effet de la modulation de CLEC12B a été étudiée *in vitro* dans les mélanocytes en culture puis confirmé dans un modèle de peau reconstruite.

CLEC12B module la synthèse de mélanine dans les mélanocytes humains normaux en culture.

Les lignées stables ainsi générées (sh-control et sh-CLEC12B ; Ov-control et Ov-CLEC12B) ont permis de montrer que CLEC12B régulait négativement la mélanogenèse dans des mélanocytes en culture. En effet, l'observation de la couleur des cellules et des culots montre une augmentation de la pigmentation dans les mélanocytes dont l'expression de CLEC12B est éteinte et, au contraire, une diminution de la pigmentation dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B. Ces observations ont été quantifiées par dosage de la quantité de mélanine dans les cellules.

La production de mélanine (mélanogenèse) fait intervenir la tyrosinase qui catalyse les multiples réactions dans la voie de biosynthèse. C'est une enzyme clef dont l'activité détermine la pigmentation. Nous avons montré une augmentation significative de l'activité de l'enzyme TYR dans les mélanocytes dont l'expression de CLEC12B est éteinte.

CLEC12B module la pigmentation dans un modèle d'épiderme reconstruit

La couleur de la peau ne reflète pas uniquement l'aptitude des mélanocytes à produire des mélanines mais aussi leur capacité à transférer et distribuer ces mélanines aux kératinocytes qui l'entourent. Il est donc essentiel d'étudier les mélanocytes dans un contexte se rapprochant au maximum de leur micro-environnement cellulaire physiologique. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'épiderme reconstruit constitué de kératinocytes humain normaux cultivés en présence de mélanocytes humains normaux dont l'expression de CLEC12B est modulée (sh-control et sh-CLEC12B ; Ov-control et Ov-CLEC12B). En accord avec les variations de pigmentation observées dans les différentes conditions (qui ont été photographiées et observées en microscopie optique), la quantité de mélanine dosée est significativement plus élevée dans les épidermes reconstruits avec les mélanocytes sh-CLEC12B par rapport aux mélanocytes contrôles et, à l'opposé, significativement plus faible dans les épidermes reconstruits avec les mélanocytes qui surexpriment CLEC12B par rapport à la condition contrôle.

Afin de visualiser la quantité de pigment présent mais aussi la distribution de la mélanine au sein de l'épiderme reconstruit, un marquage Fontana Masson a été réalisé sur les coupes de tissus. Dans la condition sh-CLEC12B, les mélanocytes sont plus gros, plus dendritiques et l'épiderme entier est plus pigmenté. Au contraire, une diminution de la pigmentation a été observée dans la condition Ov-CLEC12B par rapport au contrôle.

Il a été montré que les fibroblastes peuvent également jouer un rôle dans la pigmentation en sécrétant des facteurs qui affectent la croissance et la différenciation des mélanocytes (Yamaguchi Y. *et al.*, 2004). Il pourrait être intéressant d'utiliser un modèle de peau reconstruite sur lattice de collagène contractée par des fibroblastes (derme équivalent)

(Bell E. *et al.*, 1983) afin d'observer si les facteurs sécrétés par les fibroblastes ont un effet sur la modulation de la mélanogenèse médiée par CLEC12B.

Étude des mécanismes moléculaires impliqués

CLEC12B régule l'expression des enzymes de la mélanogenèse (TYR, TYRP1 et DCT), ainsi que leur régulateur transcriptionnel MITF.

La synthèse d'eumélanines fait intervenir les trois enzymes TYR, TYRP1 et DCT. Leur expression est régulée par le facteur de transcription MITF.

Les effets de la modulation de CLEC12B sur l'expression des enzymes TYR, TYRP1 et DCT ainsi que sur MITF ont été analysés par Western Blot. Cette analyse montre une augmentation marquée du niveau d'expression de ces protéines dans les mélanocytes sh-CLEC12B par rapport aux mélanocytes sh-contrôle. Et de façon cohérente, nous avons montré une diminution de leur expression dans les mélanocytes qui surexpriment CLEC12B par rapport aux mélanocytes contrôle. Ces résultats sont concordants avec l'effet phénotypique que nous avons observé.

CLEC12B induit la dégradation protéasomale de CREB

L'activation de la voie de l'AMPc entraîne la phosphorylation de la protéine CREB par la PKA. P-CREB se lie à des éléments de réponse à l'AMPc (CRE) et se fixe sur le promoteur de *MITF* afin de réguler sa transcription. Il est ainsi le principal régulateur de *MITF*. De manière intéressante, la surexpression de CLEC12B dans les MHN induit une diminution du niveau d'expression de la forme phosphorylée de CREB mais également de

sa forme totale. L'effet inverse est observé en condition sh-CLEC12B. Afin de déterminer si CLEC12B contribuait à cette diminution des niveaux d'expression par une régulation transcriptionnelle ou post-traductionnelle de CREB, une analyse de la quantité des transcrits de CREB a été réalisée en qPCR. La surexpression de CLEC12B n'a pas montré d'effet sur les niveaux d'ARNm de CREB. Nous avons alors cherché à savoir si la diminution d'expression de CREB était causée par sa dégradation. Le traitement des mélanocytes surexprimant CLEC12B avec un inhibiteur du protéasome (Mg132), prévient la diminution du niveau d'expression de CREB. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que CLEC12B induit la dégradation protéasomale de CREB et régule négativement MITF ainsi que les enzymes de la mélanogenèse.

CLEC12B régule la mélanogenèse via le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2

Lors de son identification comme récepteur inhibiteur dans les cellules myéloïdes, Hoffman *et al.* ont montré que CLEC12B interagissait avec les phosphatases SHP-1 et SHP-2 par l'intermédiaire de la tyrosine phosphorylée de son domaine ITIM. Cette interaction avait été montrée dans des cellules 293T transfectées avec SHP1, SHP2 ainsi que la forme sauvage ou mutée de CLEC12B. L'expérience de coimmunoprécipitation montrait que la mutation de la tyrosine du domaine ITIM abolissait le recrutement des phosphatases par CLEC12B. Cependant, cette interaction n'a jamais été montrée dans des cellules primaires non transfectées (Hoffman *et al.*, 2007).

CLEC12A, qui partage 34% de similarité avec CLEC12B, possède également un motif ITIM dans son domaine intra cytoplasmique. Marshall *et al.* ont montré, de la même manière (transfection dans une lignée cellulaire RAW264.7 de macrophage), que le récepteur CLEC12A était capable d'interagir avec SHP1 et SHP2 (mais pas avec la phosphatase SHIP). (Marshall *et al.*, 2004)

D'après Lorenz U. *et al.*, SHP1 ne serait pas exprimée dans les mélanocytes primaires. Une comparaison des niveaux d'expression de SHP1 dans des mélanocytes humains normaux en culture et des cellules connues pour en exprimer une grande quantité, la lignée LSTRA (cellules de lymphome murin), montre l'absence de SHP1 dans les mélanocytes (Lorenz U. *et al.*, 1996). SHP2 est, quant à elle, décrite comme une phosphatase dont l'expression est ubiquitaire.

Une étape clef de notre étude a ainsi visé à déterminer si ce mécanisme de recrutement et d'activation des phosphatases, qui est essentiel dans la signalisation en aval des récepteurs à domaine ITIM, était impliqué dans la régulation de la mélanogenèse par CLEC12B dans les mélanocytes. Nous avons généré, par mutagenèse dirigée, un mutant du domaine ITIM de CLEC12B, en remplaçant le résidu tyrosine Y⁷ par un résidu phénylalanine. Nous avons transduit des MHN avec un vecteur vide (ov-control), la forme sauvage de CLEC12B (ov-CLEC12B) ou sa forme mutée (ov-CLEC12B ITIM mutant). Les différents lysats ont ensuite été immunoprécipité avec un anticorps anti-CLEC12B et analysé en Western Blot avec des anticorps anti-CLEC12B, anti-SHP1 et anti-SHP2. Cette expérience nous a permis de montrer que la protéine endogène CLEC12B interagissait avec les 2 phosphatases. De plus, cette interaction est augmentée lorsque CLEC12B est surexprimé et au contraire abolie lorsque le récepteur est muté, démontrant que la tyrosine du domaine ITIM est essentielle pour le recrutement des 2 phosphatases.

Il est à noter que nos résultats sont en contradiction avec Lorenz U. *et al.* car nous détectons l'expression de SHP1 dans nos mélanocytes humains normaux en culture. Une hypothèse pourrait être que la lignée LSTRA utilisée dans leur étude comme témoin positif pour la comparaison de l'expression de SHP1 avec les mélanocytes, contient une trop grande quantité de la phosphatase, ne permettant pas sa détection en comparaison avec un type cellulaire qui l'exprimerait en plus faible quantité.

Nous avons ensuite étudié l'impact de la mutation du domaine ITIM sur la signalisation régulée par CLEC12B dans la mélanogenèse. L'analyse par Western Blot montre que la diminution des niveaux d'expression de MITF, TYR et DCT dans les mélanocytes surexprimant la forme sauvage de CLEC12B (ov-CLEC12B) est restaurée dans les mélanocytes surexprimant la forme mutée (ov-CLEC12B ITIM mutant). Ces données sont en accord avec l'absence de diminution de pigmentation observée dans les culots cellulaires et de la quantité de mélanine dosée dans les mélanocytes dans lesquels la forme mutée de CLEC12B est surexprimée.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que CLEC12B régule la mélanogenèse via le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2 sur son domaine ITIM.

De manière, à *priori*, surprenante, nous avons observé une diminution des formes phosphorylées de SHP1 et SHP2 dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B. Dans un premier temps, ce résultat nous apparut contradictoire avec les données de la littérature qui montraient que le recrutement des phosphatases à un domaine ITIM entraînait leur phosphorylation et ainsi leur activation. En effet, il a été suggéré, que la phosphorylation des 2 résidus tyrosines (résidus Y⁵³⁸ et Y⁵⁶⁴ de SHP1 ; résidus Y⁵⁴² et Y⁵⁸⁰ de SHP2) intervenaient directement dans l'activation des phosphatases, par leur interaction avec les domaines N-SH2 et C-SH2 permettant ainsi de passer de la conformation fermée/inactive à ouverte/active (Bennett AM. *et al.*, 1994). Ces phosphorylations seraient ainsi liées à une hausse de l'activité catalytique des phosphatases (Zhang ZY. *et al.*, 2003).

Cependant, Stein-Gerlach M. *et al.*, ont montré que la stimulation du récepteur à l'insuline entraînait une phosphorylation précoce de SHP2 (après seulement 30 secondes de stimulation) mais que cette phosphorylation était très transitoire car SHP2 s'auto-déphosphorylait. Ainsi les auteurs ne détectent la forme phosphorylée de SHP2 que

lorsque la phosphatase comporte une mutation qui inactive son domaine catalytique. (Stein-Gerlach M. *et al.*,1998). Ce mécanisme d'auto-inhibition pourrait expliquer nos observations. De plus, nos résultats montrent que lorsque le domaine ITIM de CLEC12B est muté, abolissant le recrutement et l'activation des phosphatases, la diminution des niveaux d'expression des formes phosphorylées de SHP1 et SHP2 est restaurée.

Hypothèses sur les mécanismes de signalisation impliqués

Plusieurs voies de signalisation, dont certaines sont connues pour être impliquées dans la régulation de la mélanogénèse, sont des cibles de SHP1 et SHP2.

Voie des MAPK

De nombreuses études ont démontré le rôle de la signalisation SCF / c-Kit dans la régulation de la mélanogénèse. Lorsque SCF se lie au récepteur c-Kit à la surface de la cellule, Ras active la kinase B-raf, puis les protéines MAPK. Les protéines de la famille MAPK, y compris ERK1/2, JNK et p38, sont connues pour jouer un rôle important dans la régulation de la synthèse de la mélanine. La phosphorylation de p38 active l'expression de MITF qui, à son tour, régule à la hausse les protéines liées à la mélanogénèse et stimule finalement la synthèse de mélanine. L'activation de ERK (c'est-à-dire la phosphorylation) peut entraîner la phosphorylation de CREB, qui se lie au motif consensus CRE de la région promotrice du *MITF* pour réguler positivement l'expression du gène *MITF*. Cependant, il a également été montré que l'activation des MAPK conduit à une inhibition de la mélanogénèse dans les cellules de mélanome murin B16 (Englaro W. *et al.*, 1998). L'activation de ERK entraîne la phosphorylation de MITF sur le résidu S⁷³ qui conduit à sa dégradation protéasomale et régule ensuite à la baisse la mélanogénèse (Wu M. *et al.*, 2000).

SHP2 et voie MAPK

La fonction la mieux établie de SHP2 est de promouvoir la voie RAS/MAPK en réponse à de nombreux agonistes. En effet, en aval de plusieurs RTK, SHP2 est nécessaire pour maintenir l'activation des MAPK et, dans certains cas, leur activation est même inexistante en l'absence de SHP2 (Neel *et al.*, 2003 ; Dance M. *et al.*, 2008).

CLEC12A, CLEC12B et voie des MAPK

En contradiction avec la fonction inhibitrice du domaine ITIM, il a été montré que CLEC12A pouvait activer la voie des MAPK via SHP2 et avoir ainsi un rôle activateur (Chen CH. *et al.*, 2006).

Des résultats préliminaires (non inclus dans notre publication en révision), ont montré une augmentation de phospho-ERK dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B.

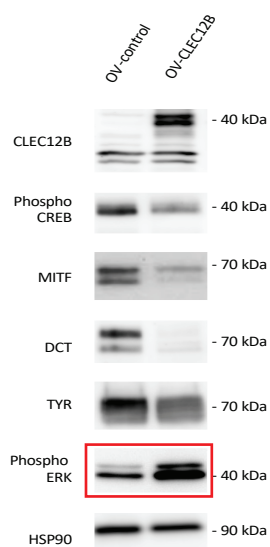


Figure 37 La surexpression de CLEC12B dans les mélanocytes humains normaux entraîne l'activation de la MAPK ERK.

Cependant, l'activation de ERK ne semble pas avoir d'effet sur l'activation de CREB qui subit une dégradation protéasomale dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B. Le mécanisme qui conduit à la dégradation de CREB n'a pas été élucidé. Il a été rapporté

qu'une hyper phosphorylation d'un motif DSVTDS situé sur CREB pouvait être la cible d'ubiquitines ligases et de son adressage au protéasome (Taylor CT. *et al.*, 2000 ; 2004).

Voie PI3K/AKT et mélanogenèse

En plus de son rôle dans l'activation de la transcription de *MITF*, l'AMPc peut également jouer un rôle dans la modification post-traductionnelle de MITF et ainsi être un point de contrôle de la mélanogenèse. L'AMPc intracellulaire inhibe la PI3K, ce qui entraîne une réduction de la phosphorylation d'AKT et de son activation, stimulant ainsi l'activité de la GSK3 β en réduisant les niveaux de p-GSK3 β . Par conséquent, l'activation de la GSK3 β par l'AMPc entraîne la phosphorylation MITF et renforce l'affinité de liaison de MITF à la M-box pour l'activation de la transcription du gène *TYR*, conduisant ainsi à une stimulation de la mélanogenèse.

SHP2 et voie PI3K/AKT

SHP2 régule l'activation de la voie PI3K mais son rôle est encore controversé (Tajan M. *et al.*, 2015). En effet, certains auteurs émettent l'hypothèse que SHP2 améliore la signalisation PI3K/AKT (Ugi *et al.*, 2004), alors que d'autres auteurs attribuent à SHP2 un rôle négatif dans la voie PI3K/AKT (Myers *et al.*, 1998 ; Ouwens *et al.*, 2001).

De plus, le rôle de SHP2 pourrait aussi dépendre de l'agoniste utilisé. En effet, il a été montré que dans un même type cellulaire, SHP2 inhibe l'activation d'AKT en réponse à l'EGF alors qu'elle stimule son activation en réponse au PDGF ou à l'IGF-1 (Zhang *et al.*, 2002).

SHP2 et Syndrome Léopard

Le syndrome LEOPARD est lié à des mutations de SHP2 affectant son activité catalytique qui sont à l'origine d'anomalies pigmentaires (essentiellement des lentigines).

Motegi S. *et al.*, ont montré que l'augmentation d'activité des mélanosomes dans les lentigines du SL serait liée à l'hyperactivation de la voie PI3K/AKT/mTOR. Les auteurs

ont également montré que la surexpression des formes mutées de SHP2 (T468P ou Y279C) dans les mélanocytes (cellules G-361) entraîne une augmentation significative de la quantité de mélanine par rapport à la surexpression de la forme sauvage. L'ajout d'un inhibiteur de mTOR, la rapamycine, empêche l'augmentation de la synthèse de mélanine dans les cellules SHP2 mutantes. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie mTOR dans les mélanocytes surexprimant SHP2 portant les mutations associées au SL pourrait être impliquée dans la stimulation de la synthèse de mélanine. Deux points sont à discuter dans cette étude. Le premier point est que la voie PI3K/AKT est normalement connue pour inhiber la mélanogénèse. De plus, il a également été montré que la rapamycine était un régulateur positif de la mélanogénèse (Young-Sool Hah *et al.*, 2012). Aussi, des essais kinases *in vitro* et *in vivo* ont démontré que AKT pouvait phosphoryler MITF (sur son résidu S⁵¹⁰) ce qui conduit à la dégradation de MITF par le protéasome et donc une régulation négative de la synthèse de mélanine (Wang *et al.*, 2016).

Cependant, de manière intéressante, les auteurs montrent une augmentation de la synthèse de mélanine dans les mélanocytes qui surexpriment la forme inactive de SHP2. Ce dernier point pourrait corroborer nos propres résultats. En effet, nous avons montré une diminution de la mélanogénèse dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B et dans lesquels SHP2 est recrutée et activée. Cette diminution est restaurée lorsqu'on surexprime la forme mutante du domaine ITIM de CLEC12B qui abolit le recrutement de SHP2. De plus, dans les mélanocytes dont l'expression de CLEC12B est modulée négativement, on observe une augmentation de la synthèse de mélanine.

Deuxième article (en révision dans Journal of Clinical Investigation) :

CLEC12B is a tumor-suppressor gene in melanoma that regulates STAT activation

L'analyse de la base de données du TCGA révèle que les patients atteints de mélanome dont l'expression de CLEC12B est faible ont une médiane de survie statistiquement plus courte que ceux avec une forte expression.

Au cours d'une seconde étude (qui est également en cours de révision et dans laquelle je suis second auteur), nous avons montré *in vitro* puis *in vivo* que CLEC12B était impliqué dans le processus de mélanomagenèse via le recrutement de SHP2 et la régulation négative de la voie JAK/STAT.

La protéine SHP2 est impliquée dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein (Zhou et Agazie, 2008), de l'œsophage (Qi C. *et al.*, 2017), du foie (Bard-Chapeau *et al.*, 2011), du colon (Huang *et al.*, 2017) et également dans le mélanome (Kim *et al.*, 2018) (Hill KS. *et al.*, 2019). Les tyrosines phosphatases, et en particulier SHP-2, sont parmi les principaux régulateurs endogènes de la voie JAK/STAT. Des travaux menés sur les cellules neurales, hématopoïétiques et les hépatocytes, ont montré que SHP-2 était capable de réprimer cette voie de signalisation par déphosphorylation des protéines STATs, notamment STAT 1 (Wu TR. *et al.*, 2002), STAT3 (Kim M. *et al.*, 2018), (Bard-Chapeau *et al.*, 2011) et STAT5 (Chen Y. *et al.*, 2003). Cette voie de signalisation est constitutivement activée dans de nombreux cancers tels que le mélanome (Bromberg and Darnell, 2000), et, de ce fait, plusieurs travaux ont présenté SHP-2 comme un gène suppresseur de tumeurs en régulant à la baisse l'expression des STATs.

Nous avons ainsi montré, *in vitro* puis dans un modèle murin, que le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-2 par CLEC12B dans les cellules de mélanome entraîne une

diminution de l'activité de la voie JAK/STAT et ainsi de la croissance tumorale. Ces résultats suggèrent que CLEC12B serait un gène suppresseur de tumeurs dans ce cancer.

V. PERSPECTIVES

Ce projet de thèse, dont la complexité résidait essentiellement sur la quasi inexistence de données publiées sur CLEC12B dans la littérature scientifique, nous a de ce fait, offert la primeur de la découverte de sa fonction dans la pigmentation cutanée.

De nombreuses perspectives s'offrent dans la continuité de ce travail que nous avons, à ce jour, seulement initié.

Dans un premier temps, il sera indispensable de poursuivre notre travail de compréhension du récepteur CLEC12B en lui-même. Sattler *et al.*, ont montré qu'il existait une deuxième isoforme de CLEC12B issue d'un épissage alternatif (Sattler *et al.*, 2010). Notre étude, en cours de publication, s'est uniquement intéressée au premier isoforme qui est la forme complète et fonctionnelle du récepteur (276 acides aminés). Le deuxième isoforme est une forme tronquée de 232 acides aminés dont le motif CTLD situé dans le domaine extracytosolique est manquant. Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire suggèrent que ce deuxième isoforme qui aurait perdu son domaine de reconnaissance aux ligands conserverait néanmoins sa fonction dans la pigmentation. Ces résultats nécessitent d'être validés par des expériences complémentaires.

Une analyse plus approfondie de la localisation subcellulaire des différents isoformes de CLEC12B pourrait également être réalisée avec une étude en microscopie électronique et un fractionnement subcellulaire.

CLEC12B contient trois sites potentiels de N-glycosylation (en position 91, 176 et 237). Nous avons montré que CLEC12B subissait des modifications post-traductionnelles avec une N-glycosylation de ses sites entraînant une augmentation de son poids moléculaire. La forme glycosylée de CLEC12B est observée à environ 40kDa en Western Blot. Après traitement à la tunicamycine (un inhibiteur de la N-glycosylation), le poids

moléculaire observé n'est plus que de 32kDa, ce qui correspond au poids prédictif de la protéine. Il serait intéressant d'étudier la pertinence fonctionnelle de ces modifications post-traductionnelles, à savoir si la glycosylation de CLEC12B pourrait affecter sa localisation et sa fonction.

Nous avons montré que CLEC12B régulaient la mélanogenèse via son interaction avec SHP1 et SHP2. Ces phosphatases sont connues pour cibler les voies MAPK et PI3K/AKT. Une expérience préliminaire nous a permis d'observer une augmentation de la forme phosphorylée de ERK dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B. Cependant, il sera nécessaire de poursuivre l'étude des voies de signalisation en aval de CLEC12B et des phosphatases afin d'identifier, plus précisément, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la pigmentation par CLEC12B et plus spécifiquement, ceux qui entraînent la dégradation de CREB.

D'autre part, il a été montré que des lectines exprimées à la surface des mélanocytes pouvaient être impliquées dans la synapse pigmentaire et permettre la reconnaissance des kératinocytes. Cependant, ces lectines n'ont jamais été identifiées. Les CTLR sont souvent décrits comme des molécules d'adhésion et de reconnaissance. Une hypothèse pourrait être que CLEC12B participerait à ce processus et jouerait donc ainsi un rôle potentiel dans le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes.

Une analyse protéomique de fibroblastes de souris KO pour la cavéoline 1 (CAV1) impliquée dans diverses fonctions cellulaires, notamment la signalisation cellulaire, le transport des lipides et le trafic membranaire, a identifié CLEC12B comme un partenaire potentiel d'interaction (Kulkarni YM. *et al.*, 2013). De plus, une étude très récente a

montré le rôle de CAV1 dans la pigmentation et le transfert de mélanosomes (Domingues L. *et al.*, 2019). Il serait très intéressant de vérifier l'interaction de CAV1 et CLEC12B dans les mélanocytes et de déterminer si cette interaction impacte le processus de mélanogenèse et de transfert des mélanosomes.

De nombreuses lectines de type C sont exprimées par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée via la reconnaissance et l'internalisation d'antigènes de types bactériens, viraux, fongiques, parasitaires ou des antigènes du soi. Elles sont également connues pour être impliquées dans le processus de tolérance immunitaire et participent à la production de cytokines. Il a été montré que les mélanocytes, de par leur nature dendritique, leur position stratégique dans la peau et leur capacité phagocytaire, peuvent internaliser et présenter des peptides antigéniques à des LT (Le Poole IC. *et al.*, 1993). Les mélanocytes seraient ainsi capables d'initier une réponse immunitaire adaptative (Tulic MK. *et al.*, 2019). Une hypothèse intéressante serait alors que CLEC12B pourrait jouer un rôle dans l'immunité de la peau. Des résultats très préliminaires ont montré une augmentation de la production d'IFN γ et des cytokines CXCL9, 10 et 11 dans les mélanocytes surexprimant CLEC12B ainsi qu'une activation de la voie JAK/STAT.

Nous avons donc élaboré un nouveau projet afin d'étudier le rôle de CLEC12B dans l'immunité de la peau. Ce projet s'articulera autour de trois axes principaux :

- Étude de l'effet de CLEC12B sur la capacité des mélanocytes à internaliser et présenter des antigènes.
- Étude de l'effet de CLEC12B sur l'activation des lymphocytes T par les mélanocytes.

- Effet de CLEC12B sur la modulation de l'expression des marqueurs CPA sur les mélanocytes en réponse à une stimulation par des antigènes bactériens (comme *staphylococcus aureus*, *streptococcus*) ou allergénique (comme les acariens) connus pour leur rôle dans la pathophysiologie de la peau.

Renforçant cette hypothèse, plusieurs CTLR du cluster Dectin-1 sont impliqués dans ces processus. Il a été montré que CLEC12A est capable d'induire l'expression de chimiokines et de cytokines ainsi que l'internalisation d'anticorps dans les cellules dendritiques (Chen CH. *et al.*, 2006). CLEC9A est capable d'induire la production de cytokines inflammatoires par l'intermédiaire de la kinase SYK (Huysamen *et al.*, 2008) et d'internaliser les antigènes par endocytose pour les diriger vers la voie endosomale/lysosomique (Sancho *et al.*, 2008). CLEC-2 peut capturer et transférer le VIH-1 infectieux en collaboration avec DC-SIGN (Chaipan *et al.*, 2006).

VI. CONCLUSION

Encore aujourd'hui, le rôle des CTLR est essentiellement restreint aux processus d'inflammation et d'immunité chez l'Homme. Il est intéressant de noter que l'attractine, un récepteur lectine de type C, a été montré pour moduler la couleur du pelage de la souris en interagissant avec la protéine agouti et régulant la voie MC1R / AMPc (Lin He *et al.*, 2001). Nous avons montré que *CLEC12B* est un gène mélanocytaire qui affecte la pigmentation de la peau chez l'Homme. Notre travail ouvre ainsi la voie sur de nouvelles fonctions des CTLR chez l'Homme qui iraient bien au-delà de l'immunité.

De manière intéressante, nous montrons que l'expression de *CLEC12B* est influencée par le phototype. *CLEC12B* est plus exprimé dans les peaux faiblement pigmentées (phototype I/II), alors qu'elle est significativement réduite chez les sujets à peau foncée (phototype V/VI). Ces résultats sont consistants avec l'effet inhibiteur de *CLEC12B* sur la mélanogenèse et suggèrent que *CLEC12B* est susceptible de jouer un rôle dans la pigmentation constitutive. La modulation de l'expression de *CLEC12B* affecte profondément la pigmentation non seulement *in vitro* mais également dans le modèle d'épiderme reconstruit humain.

Ce nouvel apport dans la compréhension de la physiologie de la pigmentation cutanée pourrait permettre, *in fine*, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir un jour au développement d'agents dans le traitement clinique des troubles pigmentaires.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abram CL, Lowell CA. The Expanding Role for ITAM-Based Signaling Pathways in Immune Cells. *Science's STKE*. 2007;2007(377):re2-re2. doi:10.1126/stke.3772007re2
2. Abram CL, Lowell CA. Shp1 function in myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017;102(3):657-675. doi:10.1189/jlb.2MR0317-105R
3. Adachi Y, Ishii T, Ikeda Y, et al. Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun*. 2004;72(7):4159-4171. doi:10.1128/IAI.72.7.4159-4171.2004
4. Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*. 2009;139(2):366-379. doi:10.1016/j.cell.2009.07.049
5. Adameyko I, Lallemand F, Furlan A, et al. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development*. 2012;139(2):397-410. doi:10.1242/dev.065581
6. Adams EL, Rice PJ, Graves B, et al. Differential High-Affinity Interaction of Dectin-1 with Natural or Synthetic Glucans Is Dependent upon Primary Structure and Is Influenced by Polymer Chain Length and Side-Chain Branching. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;325(1):115-123. doi:10.1124/jpet.107.133124
7. Albeituni SH, Ding C, Liu M, et al. Correction: Yeast-Derived Particulate β -Glucan Treatment Subverts the Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) by Inducing Polymorphonuclear MDSC Apoptosis and Monocytic MDSC Differentiation to APC in Cancer. *J Immunol*. 2016;196(9):3967. doi:10.4049/jimmunol.1600346
8. Aretz J, Wamhoff E-C, Hanske J, Heymann D, Rademacher C. Computational and experimental prediction of human C-type lectin receptor druggability. *Front Immunol*. 2014;5:323. doi:10.3389/fimmu.2014.00323
9. Ariizumi K, Shen G-L, Shikano S, et al. Identification of a Novel, Dendritic Cell-associated Molecule, Dectin-1, by Subtractive cDNA Cloning. *J Biol Chem*. 2000;275(26):20157-20167. doi:10.1074/jbc.M909512199
10. Bakker ABH, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, et al. C-Type Lectin-Like Molecule-1: A Novel Myeloid Cell Surface Marker Associated with Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res*. 2004;64(22):8443-8450. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1659
11. Bard-Chapeau EA, Li S, Ding J, et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2011;19(5):629-639. doi:10.1016/j.ccr.2011.03.023

12. Bastonini E, Kovacs D, Picardo M. Skin Pigmentation and Pigmentary Disorders: Focus on Epidermal/Dermal Cross-Talk. *Ann Dermatol.* 2016;28(3):279-289. doi:10.5021/ad.2016.28.3.279
13. Bell E, Sher S, Hull B, et al. The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol.* 1983;81(1 Suppl):2s-10s. doi:10.1111/1523-1747.ep12539993
14. Bennett AM, Tang TL, Sugimoto S, Walsh CT, Neel BG. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(15):7335-7339. doi:10.1073/pnas.91.15.7335
15. Berson JF, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell.* 2001;12(11):3451-3464. doi:10.1091/mbc.12.11.3451
16. Bertolotto C, Busca R, Ballotti R, Ortonne J. L'AMP cyclique est un régulateur de la pigmentation de la peau. *Med Sci (Paris).* 2001;17(2):177. doi:10.4267/10608/1890
17. Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol.* 1998;142(3):827-835. doi:10.1083/jcb.142.3.827
18. Bessis D. L'exception – Syndrome LEOPARD ou syndrome des lentigines multiples. 2008:4.
19. Beuret L, Ohanna M, Strub T, et al. BRCA1 is a new MITF target gene. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(4):725-727. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00862.x
20. Bléry M, Delon J, Trautmann A, et al. Reconstituted Killer Cell Inhibitory Receptors for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Control Mast Cell Activation Induced via Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs. *J Biol Chem.* 1997;272(14):8989-8996. doi:10.1074/jbc.272.14.8989
21. Boissy RE, Sakai C, Zhao H, Kobayashi T, Hearing VJ. Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp Dermatol.* 1998;7(4):198-204.
22. Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, et al. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(13):1907-1917. doi:10.1093/hmg/9.13.1907
23. Bonetti D, Troilo F, Toto A, Travaglini-Allocatelli C, Brunori M, Gianni S. Mechanism of Folding and Binding of the N-Terminal SH2 Domain from SHP2. *J Phys Chem B.* 2018;122(49):11108-11114. doi:10.1021/acs.jpcc.8b05651
24. Bossche KVD, Naeyaert J-M, Lambert J. The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. *Traffic.* 2006;7(7):769-778. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00425.x

25. Bourseguin J, Bonet C, Renaud E, et al. FANCD2 functions as a critical factor downstream of MiTF to maintain the proliferation and survival of melanoma cells. *Sci Rep*. 2016;6:36539. doi:10.1038/srep36539
26. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):33-43. doi:10.1038/nri1745
27. Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(6):374-389. doi:10.1038/s41577-018-0004-8
28. Brown J, O'Callaghan CA, Marshall ASJ, et al. Structure of the fungal β -glucan-binding immune receptor dectin-1: Implications for function. *Protein Science*. 2007;16(6):1042-1052. doi:10.1110/ps.072791207
29. Budi EH, Patterson LB, Parichy DM. Post-embryonic nerve-associated precursors to adult pigment cells: genetic requirements and dynamics of morphogenesis and differentiation. *PLoS Genet*. 2011;7(5):e1002044. doi:10.1371/journal.pgen.1002044
30. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, et al. Recruitment of Tyrosine Phosphatase HCP by the Killer Cell Inhibitory Receptor. *Immunity*. 1996;4(1):77-85. doi:10.1016/S1074-7613(00)80300-3
31. Cambier JC. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). :6.
32. Cardinali G, Ceccarelli S, Kovacs D, et al. Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2005;125(6):1190-1199. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23929.x
33. Cerdan D, Redziniak G, Bourgeois CA, Monsigny M, Kieda C. C32 human melanoma cell endogenous lectins: Characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes. *Experimental Cell Research*. 1992;203(1):164-173. doi:10.1016/0014-4827(92)90052-A
34. Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, et al. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol*. 2006;80(18):8951-8960. doi:10.1128/JVI.00136-06
35. Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2010;23(1):27-40. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x
36. Chen C-H, Floyd H, Olson NE, et al. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood*. 2006;107(4):1459-1467. doi:10.1182/blood-2005-08-3264
37. Chen Y, Wen R, Yang S, et al. Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16520-16527. doi:10.1074/jbc.M210572200

38. Chiaverini C, Beuret L, Flori E, et al. Microphthalmia-associated Transcription Factor Regulates *RAB27A* Gene Expression and Controls Melanosome Transport. *J Biol Chem*. 2008;283(18):12635-12642. doi:10.1074/jbc.M800130200
39. Chiaverini C, Sillard L, Flori E, et al. Cystinosin is a melanosomal protein that regulates melanin synthesis. *The FASEB Journal*. 2012;26(9):3779-3789. doi:10.1096/fj.11-201376
40. Choi H, Choi H, Han J, et al. IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):528-536. doi:10.1038/jid.2012.331
41. Choi W, Wolber R, Gerwat W, et al. The fibroblast-derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 18):3102-3111. doi:10.1242/jcs.064774
42. Christou CM, Pearce AC, Watson AA, et al. Renal cells activate the platelet receptor CLEC-2 through podoplanin. *Biochem J*. 2008;411(1):133-140. doi:10.1042/BJ20071216
43. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*. 1995;268(5209):405-408. doi:10.1126/science.7716543
44. Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(2):697-704. doi:10.1002/1521-4141(200002)30:2<697::AID-IMMU697>3.0.CO;2-M
45. Costin G-E, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal*. 2007;21(4):976-994. doi:10.1096/fj.06-6649rev
46. Crawford NG, Kelly DE, Hansen MEB, et al. Loci associated with skin pigmentation identified in African populations. *Science*. 2017;358(6365). doi:10.1126/science.aan8433
47. Cronin JC, Wunderlich J, Loftus SK, et al. Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22(4):435-444. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00578.x
48. Cui R, Widlund HR, Feige E, et al. Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell*. 2007;128(5):853-864. doi:10.1016/j.cell.2006.12.045
49. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7). doi:10.3390/ijms17071144

50. Daëron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest.* 1995;95(2):577-585. doi:10.1172/JCI117701
51. Daëron M, Jaeger S, Pasquier LD, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological Reviews.* 2008;224(1):11-43. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x
52. Daëron M, Latour S, Malbec O, et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intra-cytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity.* 1995;3(5):635-646. doi:10.1016/1074-7613(95)90134-5
53. Dance M, Montagner A, Salles J-P, Yart A, Raynal P. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal.* 2008;20(3):453-459. doi:10.1016/j.cellsig.2007.10.002
54. Del Bino S, Duval C, Bernerd F. Clinical and Biological Characterization of Skin Pigmentation Diversity and Its Consequences on UV Impact. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(9):2668. doi:10.3390/ijms19092668
55. Delevoye C, Giordano F, van Niel G, Raposo G. [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Med Sci (Paris).* 2011;27(2):153-162. doi:10.1051/medsci/2011272153
56. Delevoye C, Hurbain I, Tenza D, et al. AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol.* 2009;187(2):247-264. doi:10.1083/jcb.200907122
57. Derpoorter C, Vandepoele K, Diez-Fraile A, et al. Pinpointing a potential role for CLEC12B in cancer predisposition through familial exome sequencing. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(2):e27513. doi:10.1002/pbc.27513
58. Domingues L, Hurbain I, Gilles-Marsens F, et al. Caveolae coupling of melanocytes signaling and mechanics is required for human skin pigmentation. *bioRxiv.* June 2019:666388. doi:10.1101/666388
59. Domingues MJ, Larue L, Bonaventure J. [Migration of melanocytic lineage-derived cells]. *Med Sci (Paris).* 2013;29(3):287-292. doi:10.1051/medsci/2013293015
60. Dorsky RI, Moon RT, Raible DW. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature.* 1998;396(6709):370-373. doi:10.1038/24620
61. Dreger DL, Schmutz SM. A new mutation in MC1R explains a coat color phenotype in 2 "old" breeds: Saluki and Afghan hound. *J Hered.* 2010;101(5):644-649. doi:10.1093/jhered/esq061
62. Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem.* 1988;263(20):9557-9560.

63. Du J, Widlund HR, Horstmann MA, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell*. 2004;6(6):565-576. doi:10.1016/j.ccr.2004.10.014
64. Duband J-L. Neural crest delamination and migration: integrating regulations of cell interactions, locomotion, survival and fate. *Adv Exp Med Biol*. 2006;589:45-77. doi:10.1007/978-0-387-46954-6_4
65. Duband J-L. Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell Adh Migr*. 2010;4(3):458-482. doi:10.4161/cam.4.3.12501
66. Dunn KJ, Brady M, Ochsenbauer-Jambor C, Snyder S, Incao A, Pavan WJ. WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action. *Pigment Cell Res*. 2005;18(3):167-180. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00226.x
67. Elfakir A, Ezzedine K, Latreille J, et al. Functional MC1R-Gene Variants Are Associated with Increased Risk for Severe Photoaging of Facial Skin. *J Invest Dermatol*. 2010;130(4):1107-1115. doi:10.1038/jid.2009.366
68. Eller MS, Ostrom K, Gilchrest BA. DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1087-1092.
69. Englaro W, Bertolotto C, Buscà R, et al. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9966-9970. doi:10.1074/jbc.273.16.9966
70. Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, et al. Host phenotype characteristics and MC1R in relation to early-onset basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2012;132(4):1272-1279. doi:10.1038/jid.2011.402
71. Fuller GLJ, Williams JAE, Tomlinson MG, et al. The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J Biol Chem*. 2007;282(17):12397-12409. doi:10.1074/jbc.M609558200
72. Galibert M-D, 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(17):5022-5031. doi:10.1093/emboj/20.17.5022
73. Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *Journal of Infection*. 2015;71(4):413-421. doi:10.1016/j.jinf.2015.06.006
74. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):465-479. doi:10.1038/nri2569
75. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*. 2000;14(14):1712-1728.
76. Gopalasingam P. Structural characterization of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in solution. In: ; 2015.

77. Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J*. 1991;10(5):1135-1147.
78. Hah Y-S, Cho HY, Lim T-Y, et al. Induction of melanogenesis by rapamycin in human MNT-1 melanoma cells. *Ann Dermatol*. 2012;24(2):151-157. doi:10.5021/ad.2012.24.2.151
79. Halaban R, Langdon R, Birchall N, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol*. 1988;107(4):1611-1619. doi:10.1083/jcb.107.4.1611
80. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(7):1249-1260. doi:10.1007/s00018-014-1791-0
81. Hatada MH, Lu X, Laird ER, et al. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature*. 1995;377(6544):32-38. doi:10.1038/377032a0
82. He L, Gunn TM, Bouley DM, et al. A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity. *Nat Genet*. 2001;27(1):40-47. doi:10.1038/83741
83. Hearing VJ. Determination of Melanin Synthetic Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131:E8-E11. doi:10.1038/skinbio.2011.4
84. Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*. 1998;391(6664):298-301. doi:10.1038/34681
85. Henri P, Beaumel S, Guezennec A, et al. MC1R expression in HaCaT keratinocytes inhibits UVA-induced ROS production via NADPH Oxidase- and cAMP-dependent mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;227(6):2578-2585. doi:10.1002/jcp.22996
86. Hill KS, Roberts ER, Wang X, et al. PTPN11 Plays Oncogenic Roles and Is a Therapeutic Target for BRAF Wild-Type Melanomas. *Mol Cancer Res*. 2019;17(2):583-593. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-0777
87. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal Structure of the Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Cell*. 1998;92(4):441-450. doi:10.1016/S0092-8674(00)80938-1
88. Hoffmann SC, Schellack C, Textor S, et al. Identification of CLEC12B, an Inhibitory Receptor on Myeloid Cells. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22370-22375. doi:10.1074/jbc.M704250200
89. Huysamen C, Brown GD. The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors: The Dectin-1 cluster of C-type lectin-like receptors. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;290(2):121-128. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01418.x

90. Jacquemin P, Lannoy VJ, O'Sullivan J, Read A, Lemaigre FP, Rousseau GG. The transcription factor onecut-2 controls the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(5):1200-1205. doi:10.1006/bbrc.2001.5294
91. Jiménez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, et al. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem.* 1994;269(27):17993-18000.
92. Kadekaro AL, Kanto H, Kavanagh R, Abdel-Malek ZA. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;994:359-365. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb03200.x
93. Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res.* 2003;16(5):434-447. doi:10.1034/j.1600-0749.2003.00088.x
94. Kang HY, Suzuki I, Lee DJ, et al. Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. *J Invest Dermatol.* 2011;131(8):1692-1700. doi:10.1038/jid.2011.109
95. Kato Y, Zaid A, Davey GM, et al. Targeting Antigen to Clec9A Primes Follicular Th Cell Memory Responses Capable of Robust Recall. *J Immunol.* 2015;195(3):1006-1014. doi:10.4049/jimmunol.1500767
96. Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, et al. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci.* 2008;99(1):54-61. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00634.x
97. Kim DJ, Tremblay ML, Digiovanni J. Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation. *PLoS ONE.* 2010;5(4):e10290. doi:10.1371/journal.pone.0010290
98. Kim J-Y, Lee T-R, Lee A-Y. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J Invest Dermatol.* 2013;133(1):191-200. doi:10.1038/jid.2012.270
99. Kim M, Morales LD, Jang I-S, Cho Y-Y, Kim DJ. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092708
100. Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Ohnishi T, Mori T. Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 1993;101(5):685-689. doi:10.1111/1523-1747.ep12371676

101. Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Review of Dermatology*. 2011;6(1):97-108. doi:10.1586/edm.10.70
102. Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) Mutations in LEOPARD Syndrome Have Dominant Negative, Not Activating, Effects. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6785-6792. doi:10.1074/jbc.M513068200
103. Kulkarni YM, Liu C, Qi Q, Zhu Y, Klinke DJ, Liu J. Differential proteomic analysis of caveolin-1 KO cells reveals Sh2b3 and Clec12b as novel interaction partners of caveolin-1 and Capns1 as a potential mediator of caveolin-1-induced apoptosis. *Analyst*. 2013;138(22):6986-6996. doi:10.1039/c3an36819j
104. Kushimoto T, Basrur V, Valencia J, et al. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10698-10703. doi:10.1073/pnas.191184798
105. Kwon BS. Pigmentation genes: the tyrosinase gene family and the pmel 17 gene family. *J Invest Dermatol*. 1993;100(2 Suppl):134S-140S. doi:10.1111/1523-1747.ep12465022
106. Land EJ, Ito S, Wakamatsu K, Riley PA. Rate Constants for the First Two Chemical Steps of Eumelanogenesis. *Pigment Cell Research*. 2003;16(5):487-493. doi:10.1034/j.1600-0749.2003.00082.x
107. Lang D, Lu MM, Huang L, et al. Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature*. 2005;433(7028):884-887. doi:10.1038/nature03292
108. Lanier LL. Face off — the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2001;13(3):326-331. doi:10.1016/S0952-7915(00)00222-3
109. Larue L, de Vuyst F, Delmas V. Modeling melanoblast development. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(6):1067-1079. doi:10.1007/s00018-012-1112-4
110. Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*. 2004;131(19):4637-4650. doi:10.1242/dev.01350
111. Le Poole IC, Mutis T, van den Wijngaard RM, et al. A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J Immunol*. 1993;151(12):7284-7292.
112. Long EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunological Reviews*. 2008;224(1):70-84. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00660.x
113. Lorenz U, Bergemann AD, Steinberg HN, et al. Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *J Exp Med*. 1996;184(3):1111-1126. doi:10.1084/jem.184.3.1111

114. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1997;2(1):87-93.
115. Malbec O, Fridman WH, Daëron M. Negative Regulation of c-kit-Mediated Cell Proliferation by FcγRIIB. *The Journal of Immunology.* 1999;162(8):4424-4429.
116. Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. 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.* 2002;277(13):11077-11083. doi:10.1074/jbc.M111696200
117. Marshall ASJ, Willment JA, Lin H-H, Williams DL, Gordon S, Brown GD. Identification and Characterization of a Novel Human Myeloid Inhibitory C-type Lectin-like Receptor (MICL) That Is Predominantly Expressed on Granulocytes and Monocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(15):14792-14802. doi:10.1074/jbc.M313127200
118. Marshall ASJ, Willment JA, Pyż E, et al. Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation. *European Journal of Immunology.* 2006;36(8):2159-2169. doi:10.1002/eji.200535628
119. Minwalla L, Zhao Y, Cornelius J, et al. Inhibition of Melanosome Transfer from Melanocytes to Keratinocytes by Lectins and Neoglycoproteins in an In Vitro Model System. *Pigment Cell Research.* 2001;14(3):185-194. doi:10.1034/j.1600-0749.2001.140308.x
120. Mitra D, Luo X, Morgan A, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature.* 2012;491(7424):449-453. doi:10.1038/nature11624
121. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):387-402. doi:10.1038/nri2765
122. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development.* 2015;142(4):620-632. doi:10.1242/dev.106567
123. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development.* 2015;142(7):1387. doi:10.1242/dev.123729
124. Motegi S-I, Yokoyama Y, Ogino S, et al. Pathogenesis of multiple lentigines in LEOPARD syndrome with PTPN11 gene mutation. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(8):978-984. doi:10.2340/00015555-2123
125. Murisier F, Beer mann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol.* 2006;21(5):567-578. doi:10.14670/HH-21.567
126. Myers MG, Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R, White MF. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26908-26914. doi:10.1074/jbc.273.41.26908

127. Natarajan VT, Ganju P, Singh A, et al. IFN- γ signaling maintains skin pigmentation homeostasis through regulation of melanosome maturation. *PNAS*. 2014;111(6):2301-2306. doi:10.1073/pnas.1304988111
128. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(6):284-293. doi:10.1016/S0968-0004(03)00091-4
129. Noda S, Takahashi A, Hayashi T, Tanuma S, Hatakeyama M. Determination of the catalytic activity of LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutants toward parafibromin, a bona fide SHP2 substrate involved in Wnt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;469(4):1133-1139. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.117
130. Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat Commun*. 2012;3(1):884. doi:10.1038/ncomms1893
131. Olcese L, Lang P, Vély F, et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *The Journal of Immunology*. 1996;156(12):4531-4534.
132. Olivares C, Jiménez-Cervantes C, Lozano JA, Solano F, García-Borrón JC. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J*. 2001;354(Pt 1):131-139. doi:10.1042/0264-6021:3540131
133. Ono M, Okada H, Bolland S, Yanagi S, Kurosaki T, Ravetch JV. Deletion of SHIP or SHP-1 Reveals Two Distinct Pathways for Inhibitory Signaling. *Cell*. 1997;90(2):293-301. doi:10.1016/S0092-8674(00)80337-2
134. Opdecamp K, Nakayama A, Nguyen MT, Hodgkinson CA, Pavan WJ, Arnheiter H. Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development*. 1997;124(12):2377-2386.
135. Ortonne J-P. La couleur de la peau humaine : de la recherche à l'esthétique. [/data/revues/01519638/v136sS6/S0151963809725281/](#). November 2009. <https://www.em-consulte.com/en/article/232247>. Accessed October 14, 2019.
136. Ostrop J, Jozefowski K, Zimmermann S, et al. Contribution of MINCLE-SYK Signaling to Activation of Primary Human APCs by Mycobacterial Cord Factor and the Novel Adjuvant TDB. *J Immunol*. 2015;195(5):2417-2428. doi:10.4049/jimmunol.1500102
137. Ouwens DM, van der Zon GC, Maassen JA. Modulation of insulin-stimulated glycogen synthesis by Src Homology Phosphatase 2. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175(1-2):131-140. doi:10.1016/s0303-7207(01)00389-6
138. Palma AS, Feizi T, Zhang Y, et al. Ligands for the β -Glucan Receptor, Dectin-1, Assigned Using "Designer" Microarrays of Oligosaccharide Probes

(Neoglycolipids) Generated from Glucan Polysaccharides. *J Biol Chem*. 2006;281(9):5771-5779. doi:10.1074/jbc.M511461200

139. Palumbo A, Solano F, Misuraca G, et al. Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1991;1115(1):1-5. doi:10.1016/0304-4165(91)90003-Y
140. Palumbo P, d'Ischia M, Prota G. Tyrosinase-promoted oxidation of 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates. *Tetrahedron*. 1987;43(18):4203-4206. doi:10.1016/S0040-4020(01)83461-X
141. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(9):1493-1506. doi:10.1007/s00018-009-8703-8
142. Passeron T, Valencia JC, Bertolotto C, et al. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(35):13984-13989. doi:10.1073/pnas.0705117104
143. Patwardhan A, Bardin S, Miserey-Lenkei S, et al. Routing of the RAB6 secretory pathway towards the lysosome related organelle of melanocytes. *Nat Commun*. 2017;8:15835. doi:10.1038/ncomms15835
144. Paulson RF, Vesely S, Siminovitch KA, Bernstein A. Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat Genet*. 1996;13(3):309-315. doi:10.1038/ng0796-309
145. Pillaiyar T, Manickam M, Jung S-H. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discovery Today*. 2017;22(2):282-298. doi:10.1016/j.drudis.2016.09.016
146. Pillaiyar T, Manickam M, Jung S-H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular Signalling*. 2017;40:99-115. doi:10.1016/j.cellsig.2017.09.004
147. Plato A, Willment JA, Brown GD. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int Rev Immunol*. 2013;32(2):134-156. doi:10.3109/08830185.2013.777065
148. Pleines I, Elvers M, Strehl A, et al. Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch*. 2009;457(5):1173-1185. doi:10.1007/s00424-008-0573-7
149. Plonka PM, Passeron T, Brenner M, et al. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol*. 2009;18(9):799-819. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00912.x

150. Praetorius C, Grill C, Stacey SN, et al. A Polymorphism in IRF4 Affects Human Pigmentation through a Tyrosinase-Dependent MITF/TFAP2A Pathway. *Cell*. 2013;155(5):1022-1033. doi:10.1016/j.cell.2013.10.022
151. Qi C, Han T, Tang H, et al. Shp2 Inhibits Proliferation of Esophageal Squamous Cell Cancer via Dephosphorylation of Stat3. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1). doi:10.3390/ijms18010134
152. Que SKT, Weston G, Suchecki J, Ricketts J. Pigmentary disorders of the eyes and skin. *Clinics in Dermatology*. 2015;33(2):147-158. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.10.007
153. Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol*. 2001;152(4):809-824. doi:10.1083/jcb.152.4.809
154. Raposo G, Marks MS. Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):786-797. doi:10.1038/nrm2258
155. Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet*. 1997;34(8):656-665. doi:10.1136/jmg.34.8.656
156. Redelinguys P, Brown GD. Inhibitory C-type lectin receptors in myeloid cells. *Immunology Letters*. 2011;136(1):1-12. doi:10.1016/j.imlet.2010.10.005
157. Rees JL. Genetics of Hair and Skin Color. *Annu Rev Genet*. 2003;37(1):67-90. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143233
158. Rees JL. The Genetics of Sun Sensitivity in Humans. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;75(5):739-751. doi:10.1086/425285
159. Riesenbergs S, Groetchen A, Siddaway R, et al. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun*. 2015;6:8755. doi:10.1038/ncomms9755
160. Saha B, Singh SK, Sarkar C, et al. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. *Pigment Cell Res*. 2006;19(6):595-605. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00348.x
161. Sallets A, Robinson S, Kardosh A, Levy R. Enhancing immunotherapy of STING agonist for lymphoma in preclinical models. *Blood Advances*. 2018;2(17):2230-2241. doi:10.1182/bloodadvances.2018020040
162. Sancho D, Mourão-Sá D, Joffre OP, et al. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2098-2110. doi:10.1172/JCI34584
163. Sattler S, Ghadially H, Reiche D, Karas I, Hofer E. Evolutionary Development and Expression Pattern of the Myeloid Lectin-Like Receptor Gene Family Encoded

- Within the NK Gene Complex. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010;72(4):309-318. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02433.x
164. Schiöth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE, Rees JL. Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260(2):488-491. doi:10.1006/bbrc.1999.0935
 165. Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci*. 2000;113(17):3093-3101.
 166. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(4):575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
 167. Sinclair NRS, Chan PL. Relationship between Antibody-mediated Immunosuppression and Tolerance Induction. *Nature*. 1971;234(5324):104-105. doi:10.1038/234104a0
 168. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev*. 2000;80(3):979-1020. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.979
 169. Sobanov Y, Bernreiter A, Derdak S, et al. A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *European Journal of Immunology*. 2001;31(12):3493-3503. doi:10.1002/1521-4141(200112)31:12<3493::AID-IMMU3493>3.0.CO;2-9
 170. Soldati T, Schliwa M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. 2006:12.
 171. Stein-Gerlach M, Kharitonov A, Vogel W, Ali S, Ullrich A. Protein-tyrosine Phosphatase 1D Modulates Its Own State of Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.270.42.24635
 172. Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*. 2004;38:365-411. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.092717
 173. Strub T, Giuliano S, Ye T, et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*. 2011;30(20):2319-2332. doi:10.1038/onc.2010.612
 174. Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*. 2005;22(5):539-550. doi:10.1016/j.immuni.2005.05.002
 175. Suzuki-Inoue K, Fuller GLJ, García A, et al. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*. 2006;107(2):542-549. doi:10.1182/blood-2005-05-1994

176. Sweeney MC, Wavreille A-S, Park J, Butchar JP, Tridandapani S, Pei D. Decoding Protein–Protein Interactions through Combinatorial Chemistry: Sequence Specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 Domains. *Biochemistry*. 2005;44(45):14932-14947. doi:10.1021/bi051408h
177. Szabó E, Horkay I. Effect of ultraviolet light on the epidermis. *Acta Morphol Acad Sci Hung*. 1967;15(1):71-80.
178. Tadokoro R, Murai H, Sakai K, Okui T, Yokota Y, Takahashi Y. Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho-regulated membrane blebbing. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep38277
179. Tajan M, de Rocca Serra A, Valet P, Edouard T, Yart A. SHP2 sails from physiology to pathology. *European Journal of Medical Genetics*. 2015;58(10):509-525. doi:10.1016/j.ejmg.2015.08.005
180. Takeda K, Yasumoto K, Takada R, et al. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14013-14016. doi:10.1074/jbc.c000113200
181. Tang C, Makusheva Y, Sun H, Han W, Iwakura Y. Myeloid C-type lectin receptors in skin/mucoepithelial diseases and tumors. *Journal of Leukocyte Biology*. doi:10.1002/JLB.2RI0119-031R
182. Taylor CT. Regulation of intestinal epithelial gene expression in hypoxia. *Kidney Int*. 2004;66(2):528-531. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.761_12.x
183. Taylor CT, Furuta GT, Synnestvedt K, Colgan SP. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *PNAS*. 2000;97(22):12091-12096. doi:10.1073/pnas.220211797
184. Taylor LS, Paul SP, McVicar DW. Paired inhibitory and activating receptor signals. *Rev Immunogenet*. 2000;2(2):204-219.
185. Thakkar S, Wang X, Khaidakov M, et al. Structure-based Design Targeted at LOX-1, a Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Sci Rep*. 2015;5:16740. doi:10.1038/srep16740
186. Theos AC, Tenza D, Martina JA, et al. Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell*. 2005;16(11):5356-5372. doi:10.1091/mbc.e05-07-0626
187. Thomas I, Kihiczak GG, Fox MD, Janniger CK, Schwartz RA. Piebaldism: an update. *Int J Dermatol*. 2004;43(10):716-719. doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02114.x
188. Tsatmali M, Ancans J, Yukitake J, Thody AJ. Skin POMC Peptides: Their Actions at the Human MC-1 Receptor and Roles in the Tanning Response. *Pigment Cell Research*. 2000;13(s8):125-129. doi:10.1034/j.1600-0749.13.s8.22.x

189. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* 1992;11(2):519-526.
190. Tulic MK, Cavazza E, Cheli Y, et al. Innate lymphocyte-induced CXCR3B-mediated melanocyte apoptosis is a potential initiator of T-cell autoreactivity in vitiligo. *Nat Commun.* 2019;10(1):2178. doi:10.1038/s41467-019-09963-8
191. Ugi S, Imamura T, Maegawa H, et al. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2004;24(19):8778-8789. doi:10.1128/MCB.24.19.8778-8789.2004
192. Våge DI, Lu D, Klungland H, Lien S, Adalsteinsson S, Cone RD. A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat Genet.* 1997;15(3):311-315. doi:10.1038/ng0397-311
193. van der Meer JWM, Joosten LAB, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol.* 2015;68(1):40-44. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.019
194. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood.* 2007;110(7):2659-2666. doi:10.1182/blood-2007-03-083048
195. Vély F, Olivero S, Olcese L, et al. Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *European Journal of Immunology.* 1997;27(8):1994-2000. doi:10.1002/eji.1830270825
196. Virág L, Szabó E, Bakondi E, et al. Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol.* 2002;11(3):189-202.
197. Vivier E, Daëron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology Today.* 1997;18(6):286-291. doi:10.1016/S0167-5699(97)80025-4
198. Wakamatsu K, Ohtara K, Ito S. Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(4):474-486. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00580.x
199. Wan P, Hu Y, He L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. *Mol Cell Biochem.* 2011;354(1):241-246. doi:10.1007/s11010-011-0823-4
200. Wang C, Zhao L, Su Q, et al. Phosphorylation of MITF by AKT affects its downstream targets and causes TP53-dependent cell senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;80:132-142. doi:10.1016/j.biocel.2016.09.029
201. Wang J, Chandrasekhar V, Abbadessa G, Yu Y, Schwartz B, Kontaridis MI. In vivo efficacy of the AKT inhibitor ARQ 092 in Noonan Syndrome with multiple

- lentiginos-associated hypertrophic cardiomyopathy. *PLOS ONE*. 2017;12(6):e0178905. doi:10.1371/journal.pone.0178905
202. Wang Y, Viennet C, Robin S, Berthon J-Y, He L, Humbert P. Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *Journal of Dermatological Science*. 2017;88(2):159-166. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.06.018
203. Wehrle-Haller B. The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res*. 2003;16(3):287-296. doi:10.1034/j.1600-0749.2003.00055.x
204. Weiner L, Han R, Scicchitano BM, et al. Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell*. 2007;130(5):932-942. doi:10.1016/j.cell.2007.07.024
205. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*. 1998;163:19-34. doi:10.1111/j.1600-065x.1998.tb01185.x
206. Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, et al. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev*. 2000;14(3):301-312.
207. Wu TR, Hong YK, Wang X-D, et al. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47572-47580. doi:10.1074/jbc.M207536200
208. Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA null. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol*. 1998;143(7):1899-1918. doi:10.1083/jcb.143.7.1899
209. Wu X, Hammer JA. Melanosome transfer: It is best to give and receive. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;0:1-7. doi:10.1016/j.ceb.2014.02.003
210. Wu XS, Rao K, Zhang H, et al. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol*. 2002;4(4):271-278. doi:10.1038/ncb760
211. Xie J, Wu T, Guo L, et al. Molecular characterization of two novel isoforms and a soluble form of mouse CLEC-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(2):180-184. doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.070
212. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The Regulation of Skin Pigmentation. *J Biol Chem*. 2007;282(38):27557-27561. doi:10.1074/jbc.R700026200
213. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors*. 2009;35(2):193-199. doi:10.1002/biof.29
214. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Melanocytes and Their Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(5). doi:10.1101/cshperspect.a017046

215. Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol.* 2004;165(2):275-285. doi:10.1083/jcb.200311122
216. Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J.* 2008;22(4):1009-1020. doi:10.1096/fj.07-9475com
217. Yang J, Liu L, He D, et al. Crystal Structure of Human Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6516-6520. doi:10.1074/jbc.M210430200
218. Yasumoto K, Takeda K, Saito H, Watanabe K, Takahashi K, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J.* 2002;21(11):2703-2714. doi:10.1093/emboj/21.11.2703
219. Yasumoto K, Watabe H, Valencia JC, et al. Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28330-28338. doi:10.1074/jbc.M401269200
220. Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;114(2):334-342. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00874.x
221. Zhang SQ, Tsiaras WG, Araki T, et al. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol.* 2002;22(12):4062-4072. doi:10.1128/mcb.22.12.4062-4072.2002
222. Zhang Z-Y. Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2003;73:171-220.
223. Zhao X, Singh S, Pardoux C, et al. Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2010;95(1):71-78. doi:10.3324/haematol.2009.009811
224. Zhou X-D, Agazie YM. Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(6):988-996. doi:10.1038/cdd.2008.54
225. Zubair R, Lyons AB, Vellaichamy G, Peacock A, Hamzavi I. What's New in Pigmentary Disorders. *Dermatologic Clinics.* 2019;37(2):175-181. doi:10.1016/j.det.2018.12.008
226. (9) (PDF) Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/14148403_Genetic_analysis_reveals_c

- ell_type-specific_regulation_of_receptor_tyrosine_kinase_c-Kit_by_the_protein_tyrosine_phosphatase_SHP1. Accessed October 26, 2019.
227. (11) (PDF) Induction of Melanogenesis by Rapamycin in Human MNT-1 Melanoma Cells. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/224940426_Induction_of_Melanogenesis_by_Rapamycin_in_Human_MNT-1_Melanoma_Cells. Accessed November 3, 2019.
228. (11) (PDF) MITF in melanoma: Mechanisms behind its expression and activity. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/268986685_MITF_in_melanoma_Mechanisms_behind_its_expression_and_activity. Accessed October 23, 2019.
229. Albinisme-Roorick-2007-chu-bordeaux.pdf. <https://www.chu-bordeaux.fr/Les-services/Service-de-dermatologie-et-dermatologie-p%C3%A9diatrique/Pathologies/Albinisme/Albinisme-Roorick-2007-chu-bordeaux.pdf/>. Accessed October 21, 2019.
230. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options | Elsevier Enhanced Reader. doi:10.1016/j.drudis.2016.09.016
231. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes - Cheli - 2010 - Pigment Cell & Melanoma Research - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x>. Accessed October 18, 2019.
232. Inhibitory C-type lectin receptors in myeloid cells. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC3061320/>. Accessed October 10, 2019.
233. Inhibitory C-type lectin receptors in myeloid cells - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/science/article/pii/S0165247810002646?via%3Dihub>. Accessed October 10, 2019.
234. Mechanism of Folding and Binding of the N-Terminal SH2 Domain from SHP2. doi:10.1021/acs.jpcc.8b05651
235. Mediator MED23 Links Pigmentation and DNA Repair through the Transcription Factor MITF. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/28834744>. Accessed November 5, 2019.
236. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment | Nature Communications. <https://www.nature.com/articles/ncomms1893>. Accessed October 17, 2019.
237. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. - PubMed -

- NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/26530832>. Accessed November 5, 2019.
238. Negative Regulation of c-kit-Mediated Cell Proliferation by FcγRIIB | The Journal of Immunology. <https://www.jimmunol.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/162/8/4424.long>. Accessed October 8, 2019.
239. Pathogenesis of Multiple Lentigines in LEOPARD Syndrome with PTPN11 Gene Mutation. doi:10.2340/00015555-2123
240. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17702866>. Accessed October 24, 2019.
241. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/?term=Caminschi+clec+2008>. Accessed November 5, 2019.
242. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934047>. Accessed October 16, 2019.

Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3



Claire Regazzetti¹, Laura Sormani¹, Delphine Debayle², Françoise Bernerd³, Meri K. Tulic¹, Gian Marco De Donatis¹, Bérengère Chignon-Sicard⁴, Stéphane Rocchi⁵ and Thierry Passeron^{1,6}

The shorter wavelengths of the visible light spectrum have been recently reported to induce a long-lasting hyperpigmentation but only in melano-competent individuals. Here, we provide evidence showing that OPN3 is the key sensor in melanocytes responsible for hyperpigmentation induced by the shorter wavelengths of visible light. The melanogenesis induced through OPN3 is calcium dependent and further activates CAMKII followed by CREB, extracellular signal-regulated kinase, and p38, leading to the phosphorylation of MITF and ultimately to the increase of the melanogenesis enzymes: tyrosinase and dopachrome tautomerase. Furthermore, blue light induces the formation of a protein complex that we showed to be formed by tyrosinase and dopachrome tautomerase. This multimeric tyrosinase/tyrosinase-related protein complex is mainly formed in dark-skinned melanocytes and induces a sustained tyrosinase activity, thus explaining the long-lasting hyperpigmentation that is observed only in skin type III and higher after blue light irradiation. OPN3 thus functions as the sensor for visible light pigmentation. OPN3 and the multimeric tyrosinase/tyrosinase-related protein complex induced after its activation appear as new potential targets for regulating melanogenesis but also to protect dark skins against blue light in physiological conditions and in pigmentary disorders.

Journal of Investigative Dermatology (2018) 138, 171–178; doi:10.1016/j.jid.2017.07.833

INTRODUCTION

Human skin pigmentation is a complex and tightly regulated process. Solar irradiation is known to be the main factor for stimulating the pigmentation of the skin. Although UVA and UVB have both been shown to induce melanogenesis, UVB-induced pigmentation is by far the best studied process. Most of the effects of UVB on melanogenesis are mediated by the keratinocytes through the secretion of several cytokines and hormones that stimulate not only the melanogenesis but also dendritogenesis, melanosome transfer, and melanocyte proliferation (Passeron, 2016). The main mechanism is mediated by UVB-induced DNA damage that activates the p53 protein. Then, p53 binds the POMC promoter and induces the production of α MSH, which is the main pro-pigmenting hormone (Cui et al., 2007).

Although most of the known effects of solar exposure on the skin are linked to UVR, UVR accounts for only 2–5% of the solar spectrum. Visible light represents almost half of the solar spectrum, and its effects on the skin are still largely

unknown. Visible light has been shown to activate metalloproteinases and to decrease collagen production by inducing oxidative stress (Liebel et al., 2012). An intra-individual study performed on the backs of healthy volunteers also showed that visible light is able to induce a more potent and more long-lasting pigmentation compared with UVA1 (Mahmoud et al., 2010). Only dark skin-type subjects respond to visible light irradiation, whereas subjects with skin types I and II do not present any induced hyperpigmentation. Using LEDs, we further showed in the backs of healthy volunteers that the shorter wavelengths of visible light (i.e., blue-violet light at ~415 nm) induced hyperpigmentation, whereas red light (630 nm) showed no effect on pigmentation (Duteil et al., 2014). The impact of the shorter wavelengths of visible light extends beyond the induced hyperpigmentation on dark skinned individuals and contributes to the relapses of pigmentary disorders such as melasma. Thus, sunscreens protecting against these shorter wavelengths of visible light in addition to UVA and UVB showed better effectiveness for protecting against melasma relapses compared with a sunscreen having the same UVA and UVB protection but devoid of a shield against visible light (Boukari et al., 2015). This led to the development of new types of sunscreens for this medical indication. However, up to now, the mechanisms involved in visible light-induced pigmentation are completely unknown, and the absence of p53 activation after blue light irradiation suggests different factors from those known in the response to UVB (Duteil et al., 2014).

Here we dissected the mechanisms involved in visible light-induced pigmentation, and we showed a direct effect of the shorter wavelengths of visible light on melanocytes by the activation of a dedicated sensor called OPN3. The melanogenesis induced through OPN3 is calcium dependent and further activates the protein kinase CAMKII and then CREB,

¹INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), team 12, Nice, France; ²IPMC, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Nice University, France; ³L'Oreal Research and Innovation, Aulnay sous Bois, France; ⁴Department of Plastic Surgery, University Hospital of Nice, Nice, France; ⁵INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), team 1, Nice, France; and ⁶Department of Dermatology, University Hospital of Nice, France

Correspondence: Thierry Passeron, Department of Dermatology, Archet 2 Hospital, 150 route de Ginestiere, 06200 Nice, France. E-mail: passeron@unice.fr

Abbreviations: DCT, dopachrome tautomerase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; NHM, normal human melanocyte; siRNA, small interfering RNA; TYPR, tyrosinase/tyrosinase-related protein

Received 6 March 2017; revised 22 July 2017; accepted 30 July 2017; accepted manuscript published online 24 August 2017; corrected proof published online 3 November 2017

C Regazzetti et al.

Melanocytes Sense Blue Light through Opsin-3

extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p38, leading to the phosphorylation of MITF and, ultimately, to the increase of the melanogenesis enzymes tyrosinase and dopachrome tautomerase (DCT). Furthermore, blue light induces the formation of a protein complex that we showed to be formed by tyrosinase and DCT. This complex is mainly induced in dark skin melanocytes and leads to sustained tyrosinase activity, thus explaining the long-lasting hyperpigmentation that is observed only in skin type III and higher after blue light irradiation.

RESULTS

Blue light stimulates melanogenesis by acting directly on melanocytes

Blue light, and more precisely a stimulation with 415-nm light, induces hyperpigmentation of the skin. The pathway involved seems to be different from pigmentation induced by UVR. To determine the mechanism implicated, we studied the consequence of blue light stimulation on melanocytes. We irradiated normal human melanocytes (NHMs) with 415-nm light, and we studied the melanogenesis pathway. First, we observed immediately after irradiation an increase of the upper band on the blot in MITF, the master gene of pigmentation (Figure 1a). It was previously shown that this band corresponds to the phosphorylated form of MITF (Hemesath et al., 1998). To check if blue light induces the phosphorylation and the translocation of MITF (and by consequence the activation) to the nucleus, we extracted the cytoplasmic and nuclear fraction of melanocytes; lamin- β 1 was used as nuclear control and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as cytoplasmic control. MITF was mostly found in the nucleus and a slight fraction in the cytoplasm, but phosphoMITF was localized exclusively in nuclear extract and was increased upon blue light exposure (see Supplementary Figure S1a online). We confirmed the translocation of MITF after blue light stimulation by immunofluorescence (see Supplementary Figure S1b). In a dose-response experiment, we noted a slight response at 20 J/cm², but the phosphorylation of MITF requires a stimulation of 50 J/cm² (see Supplementary Figure S2 online). Two days after irradiation, tyrosinase, DCT (Figure 1b and c), melanA, and PMEL4 (see Supplementary Figure S3a online) are significantly up-regulated and the level of MITF returned to the basal level (Figure 1b and c). As expected, 10 days after the blue light exposure we observed an increase of melanin in NHMs (Figure 1d). Blue light has no effect on cell proliferation (see Supplementary Figure S3b).

The main modulation of melanogenesis induced by UV in melanocytes is mediated by the production of cytokines and hormones by keratinocytes. To assess the effect of keratinocytes in response to blue light, we used NHMs and normal human keratinocytes obtained from the foreskin of children with skin types III–IV. Normal human keratinocytes were stimulated with blue light and maintained in co-culture with NHM stimulated (or not) with blue light. We noted that normal human keratinocytes irradiated with blue light do not activate melanogenesis, and the up-regulation of tyrosinase and DCT was observed only when NHMs were stimulated directly with blue light (see Supplementary Figure S4 online).

We conclude that blue light directly stimulates the melanogenesis pathway in melanocytes.

The tyrosinase and DCT increase after blue light irradiation was confirmed in ex vivo experiments. Abdominoplasty skin (phototype IV) was irradiated with 5–90 J/cm² of blue light. Just after stimulation, we observe an immediate pigment darkening depending on light intensity (Figure 1e). Skin biopsy samples were maintained in ex vivo culture for 5 days. Total lysate confirmed the up-regulation of tyrosinase and DCT as in in vitro experiments, along with an increase in MITF (Figure 1f).

Together, these results show that blue light is able to target directly melanocytes in the skin to stimulate the melanogenesis pathway.

OPN3 senses blue light in melanocytes and mediates melanogenesis

Because most of the known effects of visible light on the skin have been related to the production of radical species, we first investigated whether this process was also involved in blue light-induced melanogenesis. We irradiated NHMs with 415-nm light and evaluated the potential protective effect of adding an antioxidant, *N*-acetylcysteine. *N*-acetylcysteine had no effect on the activation of the melanogenesis pathway (see Supplementary Figure S5a online). Thus, we investigated whether melanocytes could express direct sensors for visible light. Opsins are light-sensitive G protein-coupled receptors initially described in the eyes; several opsins have been reported in the epidermis (Haltaufderhyde et al., 2015). OPN1-SW, OPN2, OPN3, OPN4, and OPN5 have an absorption spectrum in the shorter wavelengths of visible light. Because some of them have been reported to be expressed in keratinocytes and melanocytes at least at the mRNA level, we checked their expression in NHMs. We used a primer set from previous studies in SYBR green (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) quantitative PCR (data not shown) and finally TaqMan probes (ThermoFisher Scientific), but we never detected OPN1-SW, OPN2, OPN4, and OPN5 in basal conditions or after blue light exposure. Only OPN3 (also called encephalopsin or panopsin) was significantly expressed in NHMs (Figure 2a). Its expression is 5 times higher compared with normal human keratinocytes (see Supplementary Figure S6a online). However, we did not observe modulation of OPN3 mRNA level after blue light irradiation (see Supplementary Figure 6c).

To investigate whether OPN3 could mediate the effects of blue light in NHM melanogenesis, we knocked down OPN3 in NHMs with small interfering RNA (siRNA). Because we failed to find a specific antibody against OPN3 working in our conditions, we checked the efficiency of siRNA by quantitative PCR (Figure 2b). In NHMs with siRNA directed against OPN3, blue light irradiation no longer had effect on MITF phosphorylation (Figure 2c) or on tyrosinase or DCT levels (Figure 2d). In the unstimulated conditions, the expression of MITF and DCT were found to be decreased after OPN3 siRNA. The absorption peak of OPN3 is 465 nm. We stimulated NHMs with 62.5 J/cm² of 465 light based on the 415/465-nm light ratio in solar radiation. We obtained the same results on pathways activated with 415 and 465 nm (see

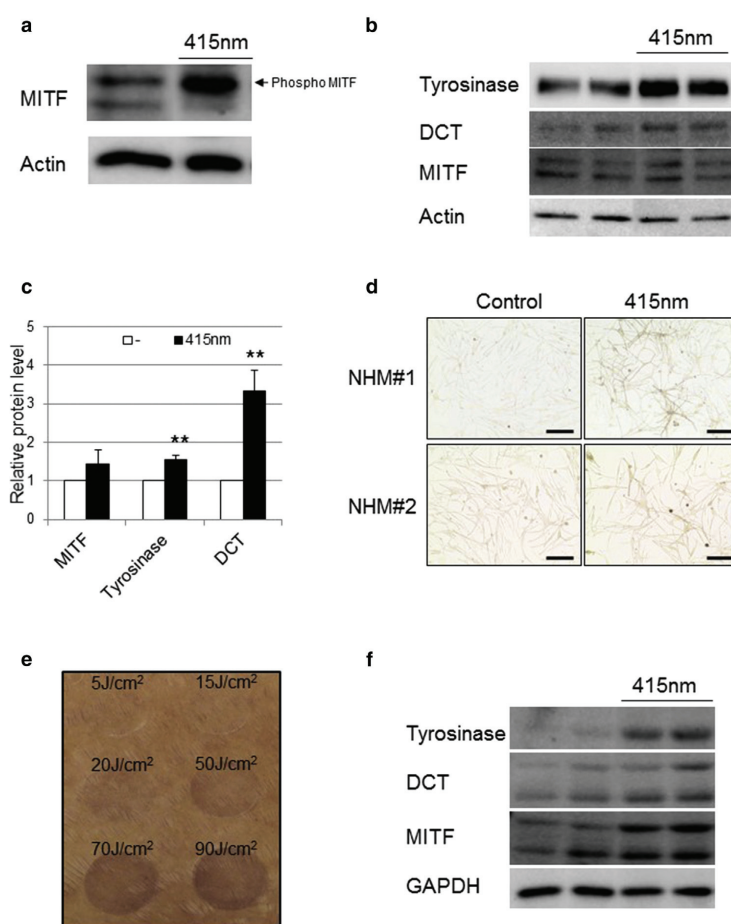


Figure 1. Blue light stimulates melanogenesis. NHMs (skin type IV) were stimulated with 50J/cm² of 415-nm light. Cells were lysed (a) immediately after stimulation or (b, c) 3 days later. (a, b) The lysate was analyzed by Western blot with indicated antibodies, and (c) the relative protein level was quantified (n = 5). NHMs (skin type V) from two different donors were stimulated one time with 50J/cm² of 415-nm light. (d) After 10 days, cells were observed with bright field microscopy. Scale bar = 100 μ m. (e) Skin abradoplasty was stimulated with 5 to 90 J/cm² of 415-nm light, biopsied, and placed in ex vivo culture for 5 days. (f) Biopsy samples were lysed, and proteins were analyzed by Western blot with indicated antibodies. ***P* < 0.005. DCT, dopachrome tautomerase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NHM, normal human melanocyte.

Supplementary Figure S5b online). Thus, in melanocytes, OPN3 senses blue light and activates melanogenesis.

Melanogenesis induced by blue light and OPN3 stimulation are calcium dependent

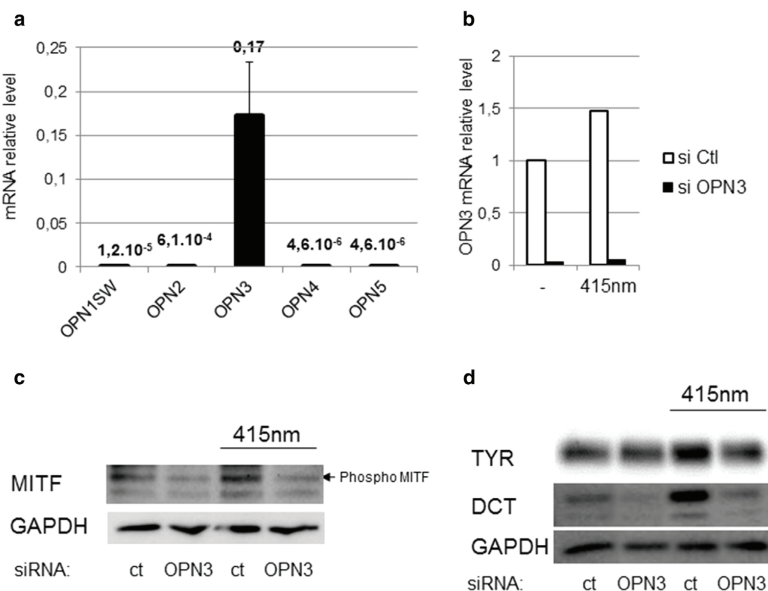
Previous studies showed that the activation of opsin receptors leads to an increase of calcium flux. To determine if blue light induces calcium flux in melanocytes, we measured it with Fluo-4 probes (ThermoFisher Scientific) in NHM irradiated with blue light. We observed an increase of calcium flux in NHM irradiated with blue light (Figure 3a) and the up-regulation of pCAMKII, a key enzyme in the calcium pathway (Figure 3b). The calcium flux increase seems to be specific to blue light, because the irradiation of NHMs with red light at 630 nm had no effect (see Supplementary Figure S7a online). This mechanism occurs specifically in melanocytes but not in keratinocytes (see Supplementary

Figure 7b) and is dose dependent (see Supplementary Figure 7c). In addition to the calcium pathway activation, blue light also induces the phosphorylation of the transcription factor CREB and the mitogen-activated protein kinases p38 and ERK, implicated in the melanogenesis pathway (Figure 3c). We then showed that the down-regulation of OPN3 in NHMs with siRNA blocks the calcium flux induced with blue light (Figure 3d) and the phosphorylation of CAMKII, CREB, ERK, and p38 (Figure 3e). Finally, to determine if the calcium flux and downstream CAMKII are responsible for melanogenesis activation, we used the calcium chelator BAPTA and the CAMKII inhibitor KN-93. These two compounds inhibit the phosphorylation of MITF, CREB, ERK, and p38 in response to blue light, confirming the role of calcium in this mechanism (Figure 3f).

We conclude that in melanocytes, blue light activates OPN3 receptor, leading to increased calcium flux. In

Figure 2. OPN3 senses blue light in melanocytes and mediates melanogenesis.

Relative expression level of opsins in NHMs (skin type IV) analyzed by quantitative PCR. (a) OPN levels were normalized with actin level (n = 6). NHMs (skin type IV) were transfected with siRNA directed against OPN3 or control. Two days later, cells were stimulated with 50 J/cm² of 415-nm light and lysed (c) immediately or (d) 3 days later. The lysate was analyzed by Western blot with indicated antibodies. The efficiency of siRNA was determined by (b) quantitative PCR. Ctl, control; ct, control; DCT, dopachrome tautomerase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; si, small interfering; TYR, tyrosinase.



response to calcium, CAMKII is phosphorylated and induces the phosphorylation of CREB, ERK, p38, and finally MITF to up-regulate melanogenesis.

Blue light induces formation of a multimeric tyrosinase/tyrosinase-related protein complex, leading to sustained tyrosinase activity in dark skin-type melanocytes

Experiments in healthy volunteers clearly showed that blue light induced a potent and long-lasting hyperpigmentation, but only in skin types III and higher (Duteil et al., 2014). We further investigated these characteristics in vitro. In addition to phosphorylation of MITF, we systematically observed on tyrosinase Western blot one additional band between 130 and 170 kDa in NHMs irradiated with blue light (Figure 4a). A previous study suggested the possibility of tyrosinase complexes with TYRP1 or DCT or tyrosinase itself that could lead to sustained tyrosinase activity (Orlow et al., 1994). To assess whether the band observed on tyrosinase blot corresponds to multimeric tyrosinase/tyrosinase-related protein (TYR/P) complexes (TYR/P proteins), we performed a proteomic assay. The assay showed the presence of tyrosinase and DCT at the molecular weight where we observed the additional band on Western blot only when NHMs were previously irradiated with blue light, suggesting the formation of tyrosinase-tyrosinase and tyrosinase-DCT complexes in response to blue light stimulation (Table 1). TYRP1 was also found at this molecular weight but in stimulated and not stimulated conditions, without significant difference between the two conditions (data not shown). The multimeric TYR/P complex formation depends on the presence of OPN3 in NHMs (Figure 4b). When we compared the response to blue light of NHMs from different skin types, we did not see any

difference concerning phosphorylated forms of MITF, CAMKII, ERK, and p38 (data not shown) and also no difference in OPN3 level (see Supplementary Figure S6b), but we observed higher expression of TYR/P complexes in skin types III–VI compared with skin types I and II (Figure 4c). Finally, we measured the tyrosinase activity in response to blue light irradiation in different skin types. In lightly pigmented NHMs, the tyrosinase activity did not change after irradiation, whereas the activity increased in dark NHMs (Figure 4d). The intense and long-lasting pigmentation observed in dark skin types could thus be explained by the formation of multimeric tyr/p complexes in response to blue light irradiation.

DISCUSSION

OPN3 is a G-protein coupled membrane receptor expressed in the human eyes but also in the brain, liver, and kidneys, suggesting that OPN3 may confer photosensitivity in extra-ocular tissues (Koyanagi et al., 2013). However, the role of OPN3 in the skin was still unknown. We showed here that the shorter wavelengths of visible light act directly on melanocytes to stimulate melanogenesis and that OPN3 serves as the sensor for blue light in melanocytes. In contrast to the skin, the effects of visible light on the eyes are well studied. Visible light allows us to see our environment thanks to the stimulation of specific sensors called Opsins. Although OPN1-SW, OPN2, OPN3, and OPN5 have previously been reported to be expressed at the mRNA level in keratinocytes and melanocytes (de Assis et al., 2016; Haltaufderhyde et al., 2015), we could only detect the expression of OPN3 in melanocytes. This difference could be explained by the difference in culture conditions of melanocytes. Although in the Haltaufderhyde et al. study melanocytes were maintained in

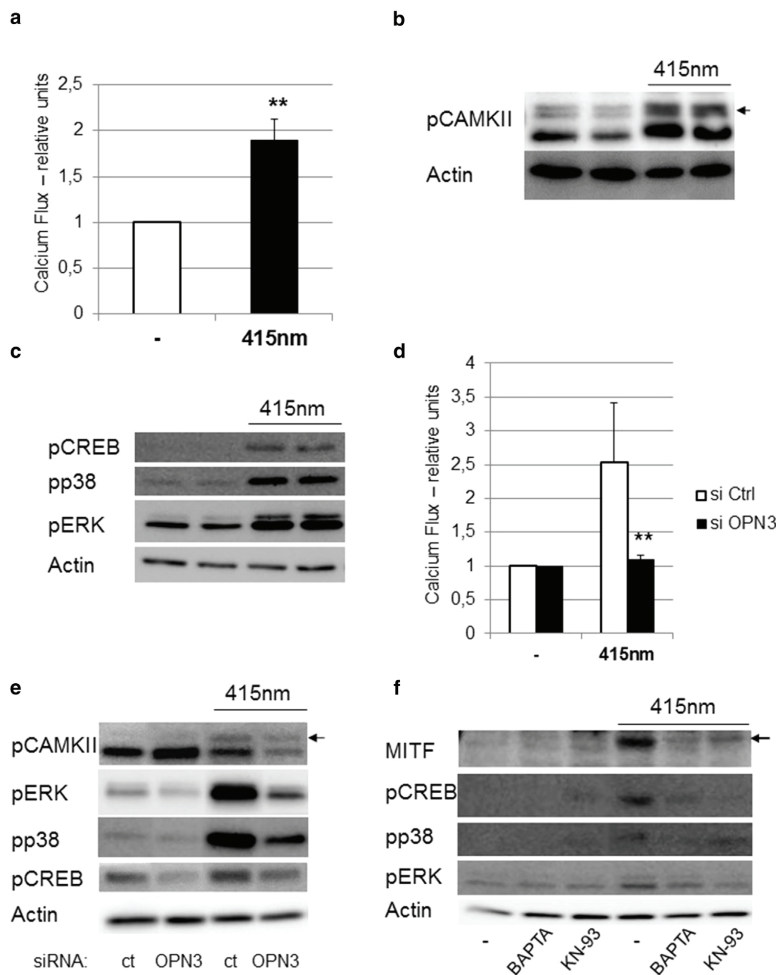
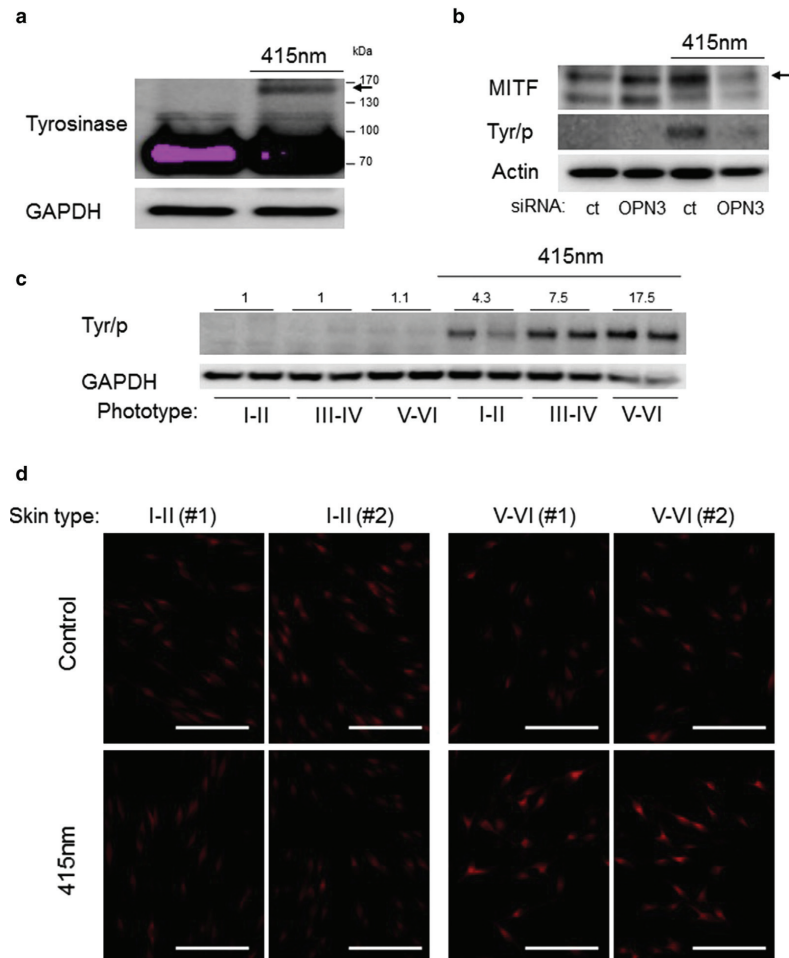


Figure 3. Melanogenesis induced by blue light and OPN3 stimulation is calcium dependent. NHM (skin type IV) were stimulated with 50J/cm² of 415nm light. Immediately after the stimulation, calcium flux was quantified with Fluo4 (a) and protein lysate was analyzed by western blot (b–c). NHM transfected with siRNA directed against OPN3 or control were stimulated with 50J/cm² of 415nm light, calcium flux was quantified with Fluo4 (d) and protein lysate was analyzed by western blot (e) NHM treated with BAPTA (3μM) or KN-93 (5μM) were stimulated with 50J/cm² of 415nm light and protein lysate was analyzed after stimulation (f). ***P* < 0.005. ct, control; Ctrl, control; ERK, extracellular signal-regulated kinase; NHM, normal human melanocyte; p, phosphorylated.

rich medium (254 Cascade medium; ThermoFisher Scientific), we cultured the cells in physiological medium MCDB153 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO). We cannot exclude the possibility that NHMs express only a very low level of other OPNs that are not detectable in our conditions but that could reach the level of detection in a medium where the cells are more activated. In the Assis et al. study, OPNs were measured in Melan-a: murine immortalized melanocytes and B16-F10: murine melanoma cells. In addition to the type of medium used, the other difference may be due to differences in expression between species (Human vs. murine) and between primary normal cells and immortalized or tumoral cells. Although the peak absorption of OPN3 is 465 nm, a recent article reported a strong absorption of OPN3 in all the shorter wavelengths of the visible spectrum with a

rapid decrease after 465 nm. (Sugihara et al., 2016). This is in agreement with our in vitro/ex vivo (this study) and in vivo (Duteil et al., 2014) data showing that only the shorter wavelengths are involved in visible light-induced hyperpigmentation. OPN3 appears to play a key role in this process, because when it is silenced the blue light is no longer able to stimulate melanogenesis. After stimulation of OPN3 by the blue light, a calcium flux is induced and activates CAMKII, then CREB, ERK, and p38, leading to the phosphorylation of MITF, increased tyrosinase and DCT, and finally the increase of melanin in cells. The demonstration of the pathway that induces melanogenesis after visible light irradiation provides potential targets to prevent this type of hyperpigmentation. Indeed, so far only physical shield (mainly iron oxide) can be used to protect skin from visible light irradiation. Targeting

Figure 4. Blue light induces formation of tyr/p complex leading to a sustained tyrosinase activity in dark phototype melanocytes. NHM (skin type IV) were stimulated with 50 mJ/cm² of 415-nm light. (a) Multimeric tyrosinase/TYRP protein was observed on tyrosinase Western blot. NHMs were transfected with siRNA directed against OPN3 or control. (b) Two days later, cells were stimulated with 50 J/cm² of 415-nm light and lysed immediately. NHMs from phototypes I and II or V and VI (two lots/conditions) were stimulated with 50 mJ/cm² of 415-nm light. (d) Two weeks later, tyrosinase activity was visualized by immunofluorescence (scale bar = 100 μm), and (c) the lysate after stimulation was analyzed by Western blot. Ct, control; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NHM, normal human melanocyte; si, small interfering.



OPN3 activation or the downstream pathway, such as the calcium pathway, should allow a chemical prevention against hyperpigmentation induced by blue light that could be of great interest for several hyperpigmentary disorders such as melasma.

Most of the known effects of visible light on skin have been linked to the production of radical species (Lieber et al., 2012). We showed here that the antioxidants are not protective against blue light-induced melanogenesis. The absence of any effect of radical species on pigmentation appears logical, because radical species are mostly produced after UVA1 irradiation and are also produced after irradiation of the whole spectrum of visible light up to the near-infrared radiations (Lohan et al., 2016), whereas the pigmentation induced by visible light occurs only with the shorter wavelengths of the visible spectrum. The use of an antioxidant in

combination with UVA-UVB sunscreen is not superior to sunscreen alone for preventing worsening of melasma after sun exposure (Ahmed et al., 2013). To the contrary, a physical protection against the shorter wavelengths of visible light in addition to UVA and UVB protection was shown to be more effective than a sunscreen with the same UVA and UVB filters but devoid of protection against the shorter wavelengths of visible light (Boukari et al., 2015). All these data argue against a role for radical species in blue light-induced pigmentation.

The key characteristics of visible light induced-pigmentation in human skin is that it is restricted to melano-competent individuals (skin types III and higher) and its long-lasting duration compared with UVA- or UVB-induced hyperpigmentation (Duteil et al., 2014; Mahmoud et al., 2010). We assessed whether OPN3 expression was

Table 1. Proteomic analysis

Molecular Weight	Condition	Gene Symbol	FDR	Description	Coverage	Peptides	Unique Peptides
130–170 kDa	Control	TYR					
130–170 kDa	Irradiated	TYR	High	Tyrosinase Homo sapiens	3	1	1
130–170 kDa	Control	DCT					
130–170 kDa	Irradiated	DCT	High	Dopachrometautomerase Homo sapiens	8	4	4

increased in melanocytes from dark skin compared with light skin donors, but we found no significant difference (see [Supplementary Figure S6b](#)). Other factors regulating its activity or the G-protein coupled receptor pathway might explain the differences between skin types. Most of the actual data concern the visual phototransduction, where several factors that could modulate opsin activity have been reported such as phosphodiesterase, arrestin, rhodopsin kinase, and recoverin ([Smith et al., 2009](#)). This area warrants further studies to try to understand the associated factors. However, we found that melanocytes extracted from skin types III–VI donors had significantly higher expression of proteins that were detected using antibodies against tyrosinase between 130 and 170 kDa only after blue light irradiation. Such proteins were suspected to be tyrosinase/TYRP1/DCT complexes and to induce a sustained tyrosinase activity ([Orlow et al., 1994](#)). However, the exact composition of this complex or its physiological role had not been determined to our knowledge. Using proteomic analysis, here we have shown that this band after blue light stimulation associates mainly tyrosinase and DCT. The multimeric TYR/P proteins are observed despite the denaturing conditions of experiments, suggesting that covalent linking is induced by blue light irradiation. Stronger formation of multimeric TYR/P proteins in dark skin types is correlated with a higher tyrosinase activity after the exposure to blue light. We conclude that at least one of the physiological roles of these multimeric TYR/P proteins is to participate in the response to blue light in melanocytes. The multimeric TYR/P proteins are not seen under basal conditions, and we did not observe differences in the formation of these complexes between skin types III–VI. We could thus hypothesize that they have no role in maintaining skin color type but are involved only in the response to visible light. The mechanisms involved in the formation of the multimeric TYR/P proteins require further investigation, but we hypothesize that one of the pathways activated by OPN3 and calcium pathway, such as protein kinase C, could be implicated ([Wu and Park, 2003](#)). Our results also help explain why only individuals with skin types III and higher are responsive to blue light and why it induces a long-lasting hyperpigmentation.

Taken together our results show the physiological role of OPN3 in an extraocular tissue. They explain the mechanistic process leading to hyperpigmentation of dark skinned individuals after irradiation with the shorter wavelengths of the visible light. Literally, human melanocytes of melano-competent skins are able to see the blue light and respond

by inducing a potent and long-lasting pigmentation through the OPN3 sensor. Furthermore, OPN3, its downstream pathway, and the multimeric TYR/P proteins appear as new potential targets for regulating melanogenesis and in protection of dark skinned individuals against blue light in physiological conditions and in pigmentary disorders.

MATERIALS AND METHODS

Reagent and antibodies

We obtained antibodies against MITF (#ab12039), pCAMKII (#ab32678), β -actin (#ab8226), PMEL (ab137062), and melanA (ab51061) from Abcam (Cambridge, MA); phosphorylated ERK (#9101), phosphorylated CREB (#9198), and phosphorylated p38 (#9211) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (#sc-25778) and lamin- β 1 (sc20682) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); phosphoMITF (Ser180/73) (SAB4503940) from Sigma Aldrich; and tyrosinase and DCT from V. Hearing.

BAPTA AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)) were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and KN93 from Santa Cruz Biotechnology. N-acetylcysteine was obtained from Sigma Aldrich.

Ex vivo skin culture

Skin from abdominoplasty surgery (phototype IV) was used for the ex vivo skin experiment as previously described ([Regazzetti et al., 2015](#)). Patient consent for experiments was not required because French laws consider human tissue left over from surgery as discarded material. Nonopposition to the use of their discarded skin was asked of each patient. The subcutaneous fat was removed, and the epidermis was irradiated with 5–90 J/cm² of 415-nm LED. Biopsy samples of 6 mm were taken from skin composed of dermis and epidermis and rapidly placed into a 0.4- μ m Transwell chamber (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and maintained under air-liquid interface culture conditions in skin culture medium (Biopredic, Saint Grégoire, France). The skin was maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

LED stimulation

The light sources used to irradiate the cells are a blue/violet LED ($\lambda = 415 \pm 5$ nm) and a blue LED ($\lambda = 465 \pm 5$ nm) (Deleoluminotherapy, St. Raphael, France). It consists of a parallelepiped-shaped aluminum box (24 × 14 cm) equipped with 154 LEDs on one face (11 lines of 14 LEDs). During stimulation, cells were maintained in phosphate buffered saline (to avoid generation of toxic molecules) at approximately 30°C, 15 cm above the light during 33 minutes to deliver 50 J/cm² of 415nm or 66 minutes to deliver 62.5 J/cm² of 465-nm light. The doses used are equivalent to those

C Regazzetti et al.

Melanocytes Sense Blue Light through Opsin-3

received by the skin during summer after proximately 90 minutes of sun exposure.

The 630-nm red light source is a parallelepiped-shaped aluminum box ($7 \times 10 \times 3$ cm) equipped with six LEDs on one face (two lines of three LEDs). The cells are irradiated with 50 J/cm^2 of 630-nm light for 27 minutes.

The light source used to irradiate the skin from abdominoplasty is a blue/violet LED ($\lambda = 415 \pm 5 \text{ nm}$) (Deleoluminotherapy). It consists of a parallelepiped-shaped aluminum box ($7 \times 10 \times 3$ cm) equipped with six LEDs on one face (two lines of three LEDs). The doses delivered by this system were 5, 15, 20, 50, 70, and 90 J/cm^2 between 4 and 72 minutes. Surface of exposed test areas was a circle of 2-cm diameter.

Statistical analyses

Statistical differences between groups were analyzed with a Student *t* test. Differences were considered significant at $P < 0.01$.

Additional method information is provided in the [Supplementary Materials](#) online.

ORCID

Thierry Passeron: <http://orcid.org/0000-0002-0797-6570>

CONFLICT OF INTEREST

Grant from Lancôme and L'Oreal Research and Innovation. The results of this work are under a patenting process. FB is a L'Oreal employee. TP has received grants from Lancôme and L'Oreal Research and Innovation.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire microscopy and image facility. We thank DELEO Company for providing LED systems.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and a grant from Lancôme and L'Oréal Research and Innovation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CR conceived and performed the experiments and wrote the manuscript. LS, DD, and GMDD performed experiments. FB, MKT, and SR provided technical help, expertise and feedback. BCS provided skin material. TP conceived experiments, supervised the entire study, and wrote the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.833>.

REFERENCES

- Ahmed AM, Lopez I, Perese F, Vasquez R, Hynan LS, Chong B, et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of oral *Polypodium leucotomos* extract as an adjunct to sunscreen in the treatment of melasma. *JAMA Dermatol* 2013;149:981–3.
- Boukari F, Jourdan E, Fontas E, Montaudie H, Castela E, Lacour JP, et al. Prevention of melasma relapses with sunscreen combining protection against UV and short wavelengths of visible light: a prospective randomized comparative trial. *J Am Acad Dermatol* 2015;72:189–90.

Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 2007;128:853–64.

de Assis LV, Moraes MN, da Silveira Cruz-Machado S, Castrucci AM. The effect of white light on normal and malignant murine melanocytes: a link between opsins, clock genes, and melanogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(6 Pt. A):1119–33.

Duteil L, Cardot-Leccia N, Queille-Roussel C, Maubert Y, Harmelin Y, Boukari F, et al. Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with UVB exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:822–6.

Haltaufderhyde K, Ozdeslik RN, Wicks NL, Najera JA, Oancea E. Opsin expression in human epidermal skin. *Photochem Photobiol* 2015;91:117–23.

Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 1998;391(6664):298–301.

Koyanagi M, Takada E, Nagata T, Tsukamoto H, Terakita A. Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:4998–5003.

Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *J Invest Dermatol* 2012;132:1901–7.

Lohan SB, Muller R, Albrecht S, Mink K, Tschersch K, Ismael F, et al. Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - in vivo versus ex vivo study. *Exp Dermatol* 2016;25:380–5.

Mahmoud BH, Ruvolo E, Hessel CL, Liu Y, Owen MR, Kollias N, et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol* 2010;130:2092–7.

Orlow SJ, Zhou BK, Chakraborty AK, Drucker M, Pifko-Hirst S, Pawelek JM. High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex. *J Invest Dermatol* 1994;103:196–201.

Passeron T, Ortonne J-P. Atlas of pigmentary disorders. Cham, Switzerland: Springer; 2016.

Regazzetti C, Joly F, Marty C, Rivier M, Mehl B, Reiniche P, et al. Transcriptional analysis of vitiligo skins reveals the alteration of WNT pathway: a promising target for repigmenting vitiligo patients. *J Invest Dermatol* 2015;135:3105–14.

Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR. Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet* 2009;25:156–65.

Sugihara T, Nagata T, Mason B, Koyanagi M, Terakita A. Absorption characteristics of vertebrate non-visual opsin, Opn3. *PLoS One* 2016;11(8):e0161215.

Wu H, Park HY. Protein kinase C-beta-mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:948–53.











This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09963-8>

OPEN

Innate lymphocyte-induced CXCR3B-mediated melanocyte apoptosis is a potential initiator of T-cell autoreactivity in vitiligo

Meri K. Tulic ¹, Elisa Cavazza¹, Yann Cheli ², Arnaud Jacquelin ³, Carmelo Luci ⁴, Nathalie Cardot-Leccia⁵, Hanene Hadhiri-Bziouche¹, Patricia Abbe¹, Maéva Gesson ⁶, Laura Sormani¹, Claire Regazzetti¹, Guillaume E. Beranger ¹, Cedric Lereverend ², Caroline Pons¹, Abdallah Khemis⁷, Robert Ballotti², Corine Bertolotto², Stéphane Rocchi¹ & Thierry Passeron ^{1,7}

T-cells play a crucial role in progression of autoimmunity, including vitiligo, yet the initial steps triggering their activation and tissue damage remain unknown. Here we demonstrate increased presence of type-1 innate lymphoid cells (NK and ILC1)-producing interferon gamma (IFN γ) in the blood and in non-lesional skin of vitiligo patients. Melanocytes of vitiligo patients have strong basal expression of chemokine-receptor-3 (CXCR3) isoform B which is directly regulated by IFN γ . CXCR3B activation by CXCL10 at the surface of cultured human melanocytes induces their apoptosis. The remaining melanocytes, activated by the IFN γ production, express co-stimulatory markers which trigger T-cell proliferation and subsequent anti-melanocytic immunity. Inhibiting the CXCR3B activation prevents this apoptosis and the further activation of T cells. Our results emphasize the key role of CXCR3B in apoptosis of melanocytes and identify CXCR3B as a potential target to prevent and to treat vitiligo by acting at the early stages of melanocyte destruction.

¹Team 12, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ²Team 1, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ³Team 2, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ⁴Team 8, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ⁵Côte d'Azur University, Department of Pathology, CHU Nice, Nice 06200, France. ⁶Imaging Facility, Nice 06200, France. ⁷Côte d'Azur University, Department of Dermatology, CHU Nice, Nice 06200, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.K.T. (email: meri.tulic@unice.fr) or to T.P. (email: passeron@unice.fr)

During the past decade significant advances in the understanding of vitiligo pathophysiology have been made. Large GWAS studies showed the role of allelic variations in genes involved in melanogenesis and immunity in vitiligo patients^{1–3}. The development of mouse models provided very useful clues on the implication of the adaptive immune system in the disappearance of melanocytes in the skin and hair follicles^{4–7}. Recent data emphasized the key role of the interferon gamma (IFN γ) pathway in vitiligo. It has been recently shown that under IFN γ stimulation, keratinocytes are stimulated to produce chemokines, such as CXCL9 or CXCL10, that further attract and activate CD8⁺ T cells⁸. Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3) is the main receptor for these chemokines and it has been reported to be increased in vitiligo patients⁹. Targeting total CXCR3 by using depleting antibodies has provided encouraging results in vitiligo mouse model¹⁰. However, the initial source of IFN γ remains obscure. Using transcriptional analysis, we recently demonstrated a significant increase in CXCL10 in the non-lesional (NL) vitiligo skin compared to healthy controls¹¹. Significant increases were also seen for natural killer (NK) receptors including NKTR and KLRC1 as well as trends for increased EOMES (master regulator of NK cells), CCL20 and NK-related cytokines (TNF α and IL-15) which were all increased at least 1.5-fold but did not reach statistical significance¹¹. These data are in accordance with the first transcriptome analysis comparing gene expression profiles of skin from vitiligo patients with normal skin of healthy volunteers that showed an increased expression of genes associated with innate immune responses, particularly NK cell function, activity and cytotoxicity¹². These included multiple NK cell activation markers such as KLRK1 (also known as NKG2D), KLRC2 and KLRC4, ligands for NK receptor (CLEC2B), as well as markers of oxidative stress (CANP and POSTN) and innate immunity (DEFB103A). Interestingly, all of these genes were also upregulated in the NL skin of vitiligo patients, suggesting that the activation of the innate immunity may be present throughout the entire skin surface of vitiligo patients.

NK cells are part of the group 1 innate lymphoid cells (ILC1) that act as first line defense against microbial and viral infections, early cellular transformation and tumour growth¹³. NK cells have potent cytotoxic function and are able to discriminate and eliminate stressed-cells because of a large panel of activating and inhibitory receptors. Furthermore, NK cells also produce a wide array of cytokines and chemokines to recruit and instruct other immune cells for subsequent priming (adaptive response)^{14,15}. For this reason, NK cells are described as a bridge between innate and adaptive immune system. It's been known for almost 30 years that there is an increase in circulating NK cells in the blood of vitiligo patients¹⁶, yet their role in vitiligo skin remains largely unexplored. In addition to NK cells, the ILC family encompasses ILC1, ILC2, ILC3 and ILC regulatory subclasses. Similarities between ILCs subsets have led to suggestions that ILCs are the innate counterparts of T cell subsets. These are equivalent to

adaptive immune system T-helper (Th)1, Th2, Th17 and Treg-like, respectively. ILCs are scarce cells in normal human skin but are upregulated in atopic dermatitis (ILC2) and psoriasis skin (ILC3)¹⁷. Latest research suggests that ILCs are highly heterogeneous cell types between individuals and tissues and they can even convert to a different subtype during inflammation and disease (eg., ILC3 converting to ILC1 in colorectal cancer)¹⁸.

Together these data suggest that NK cells and innate immune system may play an important role in the early stages of vitiligo which may begin in normal-appearing, NL skin of the patient. On the other hand, it has been demonstrated that melanocytes from vitiligo patients have intrinsic defects¹⁹. Moreover, there have been some clues in the literature from work published over 20 years ago showing that melanocytes themselves can present antigens^{20,21}. Clinical and histological data showing a restrained immunity against melanocytes in halo nevi²² or in localized depigmentation of genital melanosis²³ strongly suggest the key role of melanocytes in initiating the anti-melanocytic immunity. However, the exact role of melanocytes in triggering the initial steps of auto-immunity in vitiligo is far from being fully understood.

We hypothesized that vitiligo is initiated by dysregulation in innate immunity and melanocytes, and that innate immune cells are the initial source of IFN γ production in the skin. Due to their potent IFN γ producing capacity, we chose to focus on NK/ILC1 in this study. Our objective was to assess the role of the innate immunity and melanocytes in the initial steps of vitiligo by using melanocytes and blood extracted from vitiligo patients compared to healthy volunteers. Here we show data suggesting that vitiligo is likely to be initiated in the normal-appearing skin of vitiligo subjects through activation of local innate lymphocyte-induced melanocyte apoptosis and subsequent activation of adaptive and memory immune responses. This apoptosis is mediated by melanocytic CXCR3B, identifying this isoform of CXCR3 chemokine receptor to be critical in melanocyte destruction and initiation of the disease.

Results

Increased NK and ILC1 in vitiligo skin and blood. To characterise the innate immune cells present in the skin and blood of vitiligo patients and to examine whether these cells were the source of IFN γ , we used specific antibodies directed against NK and ILC1 subpopulation of innate immune cells and examined their presence in vitiligo patients compared to healthy controls²⁴. Characteristics of vitiligo and control populations are presented in Table 1. Our immunofluorescence results have shown that indeed, cytotoxic NK cells (defined as CD56 + Granzyme B+) containing IFN γ (CD56 + IFN γ +) were present in NL human vitiligo skin (Fig. 1a, b). Their presence was confirmed by immunohistochemistry, and these cells were located just under the epidermis of NL but not in lesional (L) skin (Fig. 1c). Semi-quantification of their detection has shown significantly higher

Table 1 Patient characteristics

Characteristics	Healthy	Vitiligo
Subjects (n)	8	14
Age (years), median (IQR)	51 (39–74)	48 (43–56)
Gender (male/female)	5/3	7/7
Disease duration	-	4 months–14 years
Family history (%)	-	1 (7%)
Auto-immune thyroid disease (%)	-	2 (14%)
Location of biopsy (n)	Inner arm (3), leg (2), back (1), abdomen (1) and buttock (1)	Inner arm (5), leg (3), back (2), abdomen (2) and buttock (2)

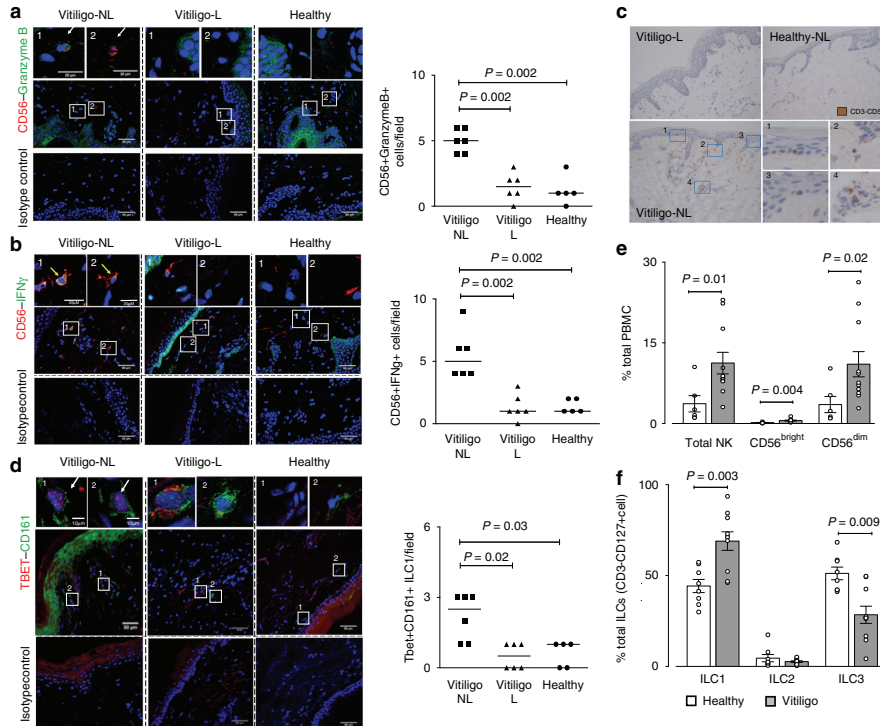


Fig. 1 Increased detection of innate immune cells in non-lesional skin of vitiligo patients. Immunofluorescence depicting NK cells (**a, b, c**) and ILC1 (**d, e**) in the skin and in the peripheral blood (**f, g**) of vitiligo patients ($n = 6$) and healthy controls ($n = 5$). Number of yellow-immunoreactive CD56 + GranzymeB+ NK cells and their semi-quantification in non-lesional (NL) and lesional (L) skin of vitiligo patient compared to healthy skin are shown in **a** and the number of CD56+IFN γ +NK in **b**. The presence of NK cells (CD3-CD56+) was confirmed by immunohistochemistry showing cells to be located just under the epidermis of non-lesional (NL) skin (**c** bottom left and magnified in 1-4) but less in lesional (L) or healthy skin (**c** top right). **d** Depicts Tbet+CD161+ILCs in the skin and their quantification. In the peripheral blood total NK and separately, cytokine producing NKs (CD56^{bright}) and cytotoxic NKs (CD56^{dim}) were examined in 6 healthy and 11 vitiligo patients and results represented as % of total PBMC (**e**). The percentage of ILC1, ILC2 and ILC3 in the blood of healthy ($n = 8$) and vitiligo ($n = 10$) patients is shown in **f**. Results are shown as individual dot plots with a line at median (**a-d**) or as means \pm SEM (**e, f**)

number of CD56 + Granzyme B+ cells and CD56 + IFN γ +cells in NL compared to L skin of vitiligo patients ($n = 6$) and a higher number in NL skin of vitiligo patients compared to healthy skin ($n = 5$) (Fig. 1a, b). We have also detected presence of Tbet + CD161+ ILC1 in vitiligo skin (Fig. 1d) which were confirmed to be negative for CD3 and CD56 and positive for IL-7R α CD127. Like NK cells, ILC1 cells were significantly more detected in NL vitiligo skin compared to L vitiligo skin or to healthy controls (Fig. 1d).

Next, we went on to examine whether similar differences in the number of innate immune cells was seen in the peripheral blood. Total NK cells make up ~1–5% of total PBMC in healthy subjects (Fig. 1e). The majority of NK cells were CD56^{dim}, that is, the cytotoxic phenotype (~90%). Total NK population (CD3-CD56+), cytokine-producing CD56^{bright} NK cells as well as cytotoxic CD56^{dim} NK populations were significantly increased in the blood of vitiligo patients ($n = 11$) compared to healthy controls ($n = 6$) (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1a). The higher increase was observed for CD56^{bright} NK cells. ILCs are rare cells making up < 0.1% of total PBMC. In healthy subjects, ILC1 and ILC3 (defined

as Lin-CD127 + CRTh2-CD117– and Lin-CD127+CRTh2-CD117+cells, respectively), each made up 30–40% of total ILC population, with ILC2 (defined as Lin-CD127+CRTh2 + CD117+ cells) making up the rest (Fig. 1f and Supplementary Fig. 1b). We have shown the proportion of ILC1 in PBMC of vitiligo subjects ($n = 10$) to be significantly increased compared to controls ($n = 8$) while the proportion of ILC3 was significantly decreased and ILC2 remained unchanged (Fig. 1f). Together, these results have shown that there is increased presence of NK and ILC1 in the NL skin of vitiligo patients and in their peripheral blood.

Stressed NK/ILC1 produce IFN γ and induce melanocytic chemokines. Hydrogen peroxide can damage DNA, lipids, and proteins and induces damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules that are one of the main activating factors for innate cells. It is well demonstrated that vitiligo melanocytes possess higher susceptibility to oxidative insults^{25,26}. We sorted NK and total ILCs from PBMC of healthy (C) and vitiligo (V) patients and examined their IFN γ responses 24, 48 and 72 h post stimulation

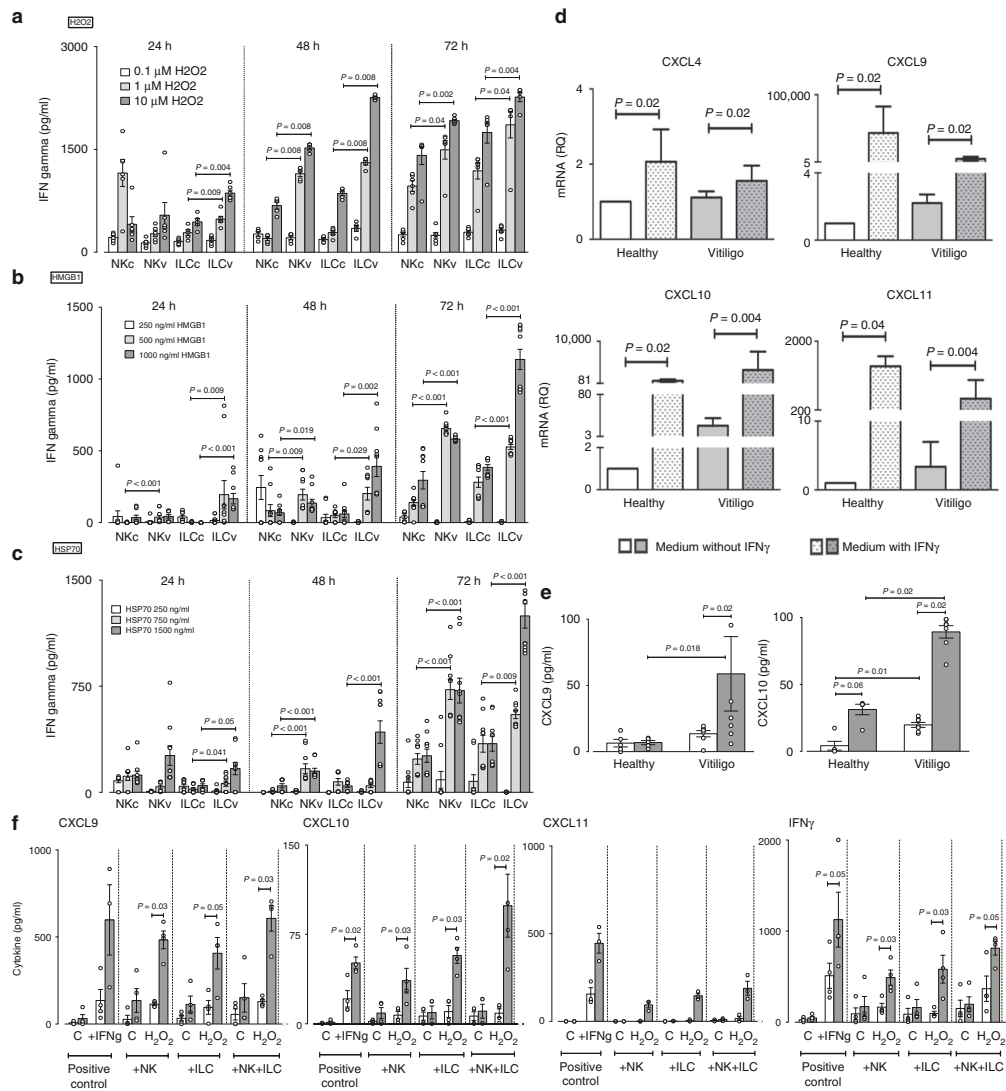


Fig. 2 Effect of stressed innate immune cells on melanocyte function. IFN γ production by sorted NK and ILCs from blood of healthy control (c , $n = 6-10$) and vitiligo (v , $n = 6-10$) subjects following *in vitro* stimulation with H $_2$ O $_2$ (0.1-10 μ M) (**a**), HMGB1 (250-1000 ng/ml) (**b**) or HSP70 (TKD, 250-1500 ng/ml) (**c**) for 24, 48 or 72 h. The effect of exogenous IFN γ (50 ng/ml) on CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 mRNA (**d**) and CXCL9, CXCL10 protein (**e**) production by healthy ($n = 4-7$) and vitiligo melanocytes ($n = 7-9$). In **f** chemokine and IFN γ production was measured 24 h post stimulation of healthy (white bars, $n = 4$) or vitiligo (grey bars, $n = 4$) melanocytes with patient's own *autologous* NK or ILCs (alone or in combination) which were pre-stressed with H $_2$ O $_2$ for 48 h before addition of innate cells to patients own melanocytes. Positive control condition represents melanocytes directly pre-stimulated with IFN γ (50 ng/ml) for the same duration of time. PCR results are normalized to house-keeping gene SB and expressed as fold change in expression relative to the pool of healthy skin samples. Results are shown as individual dot plots with a line either at median (**a-c**) or at mean \pm SEM (**e, f**)

with H $_2$ O $_2$ (to induce oxidative stress in cells). Results have shown H $_2$ O $_2$ to induce IFN γ production in both NK and ILCs and this effect was dose- and time-dependent (Fig. 2a). The stress-induced IFN γ production by NK and ILCs from vitiligo subjects were significantly higher compared to healthy subject's responses at the

same dose (Fig. 2a) suggesting vitiligo innate cells were more sensitive to oxidative stress compared to cells from healthy controls. Innate cells can be activated by many DAMPs. Among them, the role of HSP70 Heat Shock Protein (HSP70) and High Mobility Group Box (HMGB1) in vitiligo pathogenesis have been suggested

by several studies^{27–29}. Thus, we reproduced the experiment with NK and total ILCs from PBMC of healthy (C) and vitiligo (V) patients and this time examined their IFN γ responses after stimulation with HMGB1 (Fig. 2b) or HSP70 (Fig. 2c). Similar to the results obtained following H₂O₂ stimulation, HMGB1- and HSP70-induced IFN γ production by NK and ILCs were dose- and time-dependent and responses from vitiligo melanocytes were significantly higher compared to responses in melanocytes from healthy individuals at the same dose.

Next, we set out to examine if primary melanocytes can directly respond to IFN γ . Stimulation of normal human melanocytes (NHM, $n = 5$) with IFN γ for 24 h significantly upregulated their production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 mRNA (Supplementary Fig. 2) ($P < 0.05$). The production of these chemokines was higher in normal human keratinocytes (NHK, $n = 6$), the known potent producers of chemokines, compared to NHM (Supplementary Fig. 2). Knowing that NHM upregulate their chemokine production following IFN γ stimulation, we asked whether this chemokine production varies between healthy and vitiligo melanocytes. Stimulation of healthy or vitiligo melanocytes with IFN γ induced a significant increase in mRNA expression of CXCL4, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 (Fig. 2d). However, the production of CXCL9 and CXCL10 was much higher comparatively to CXCL11. Only very limited amount of CXCL4 were detected. Non-stimulated vitiligo melanocytes had significantly higher baseline (or constitutive) production of CXCL10 compared to healthy melanocytes (Fig. 2e). Stimulation with IFN γ significantly increased both CXCL9 and CXCL10 protein in the supernatant of vitiligo melanocytes, producing on average 4–5 fold more chemokines compared to healthy controls (Fig. 2e). Together, these results suggest vitiligo melanocytes are more sensitive to IFN γ stimulation and may have greater chemo-attractive properties.

Next, we wanted to examine if stressed innate immune cells can directly modulate melanocyte function. To do this, we sorted NK and ILC1 from the PBMCs of healthy and vitiligo patients, pre-stressed them *in vitro* with H₂O₂ for 48 h and transferred the innate cells (without media) to their own *autologous* primary melanocytes. Chemokine production was measured in the supernatant 24 h after co-culture. Results have shown that the addition of pre-stressed innate cells from healthy subjects to their own primary melanocytes did not cause any significant change in melanocyte chemokine production (Fig. 2f). However, addition of pre-stressed NKs or ILCs from vitiligo patients dramatically increased their own melanocyte production of CXCL9, CXCL10, CXCL11 and IFN γ (Fig. 2f). This effect was further increased when both pre-stressed NKs and ILCs were added together and these levels were equal to, or greater than the responses seen when exogenous IFN γ was added to melanocytes (positive control condition). This data suggest that stressed innate immune cells are capable of directly modulating melanocyte function by upregulating their chemokine responses and thereby their chemo-attractive properties. Importantly, these results show that vitiligo melanocytes (compared to healthy melanocytes) are much more sensitive to their own stressed innate immune cells. It is important to note that although the cells were stimulated for 48 h with H₂O₂ prior to transfer with melanocytes, these cells were still capable of producing IFN γ and effectively modulating melanocyte function (Fig. 2f). To examine if NKs and/or ILCs are directly capable of producing chemokines in response to stress, we measured the production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 by NKs and ILCs after stimulation with HMGB1 or HSP70. NK/ILC production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 following innate stress was negligible (and often undetectable in the case for CXCL10) compared to their IFN γ production following the same stress stimuli (Supplementary Fig. 3). Moreover, this NK/ILC

production of chemokines is also negligible compared to the chemokine production by melanocytes (Fig. 2f).

Human melanocytes express CXCR3B and it's regulated by IFN γ . CXCR3, a chemokine CXCL9, CXCL10 and CXCL11 receptor, is typically found on T cells, where the predominant isoform expressed is of the CXCR3A form³⁰. Whether CXCR3 is expressed on human melanocytes is unknown. Here we demonstrate that melanocytes isolated from healthy human skin express CXCR3, particularly the CXCR3B isoform (Fig. 3). This isoform is absent in mice and therefore not possible to study in animal models of vitiligo. In human skin, CXCR3B was detected at mRNA (Fig. 3a) and protein (Fig. 3b) level in cultured melanocytes and their numbers semi-quantitated in Fig. 3c. We demonstrated melanocytes isolated from vitiligo skin have significantly elevated expression of CXCR3B at baseline compared to healthy control skin (Fig. 3a). IFN γ significantly upregulated CXCR3B mRNA expression in both healthy and vitiligo patients (Fig. 3a). While IFN γ significantly increased the number of CXCR3B+ cells in healthy skin, IFN γ had no further effect on vitiligo melanocytes whose CXCR3B expression was already high (Fig. 3c). Expression of CXCR3B in healthy human keratinocytes was significantly lower than the expression in healthy melanocytes which was confirmed at both mRNA and protein level (Fig. 3a, b). Interestingly, IFN γ had no effect on keratinocyte expression of CXCR3B (Fig. 3a, b). Finally, we have demonstrated that there is an increased number of MITF + CXCR3B+ melanocytes in the NL skin of vitiligo patients compared to healthy skin ($P = 0.03$) (Fig. 3d). MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), is a specific melanocyte marker and a master regulator of melanocyte development.

CXCL10 activates melanocytic CXCR3B to induce apoptosis. From previously published literature in human breast cancer³¹ there is evidence to suggest that CXCR3B-mediated signal is pro-apoptotic. To examine the function of CXCR3 on viability of human vitiligo melanocytes, real-time detection of melanocyte death was monitored before and after exposure to CXCL10 using IncuCyte[®] live cell imaging system. Stimulation with CXCL10 caused a significant dose-dependent increase in melanocyte death compared to non-stimulated melanocytes but only in IFN γ primed melanocytes ($P = 0.006$, Fig. 4a). As CXCR3B-specific antagonists do not exist yet, initially we tested the effect of a broad CXCR3 antagonist AS612568 on CXCL10-induced melanocyte death. We have demonstrated AS612568 to inhibit melanocyte death induced by CXCL10 in a dose-dependent manner, completely abolishing CXCL10-induced effects at 2 μ M ($P = 0.045$, Fig. 4a). Following these positive results, we set out to use a more targeted approach transfecting the melanocytes with siCXCR3 (or siControl). The knockdown efficiency of our siCXCR3 was determined at both mRNA (Supplementary Fig. 4a) and protein (Supplementary Fig. 4b) level, achieving >80% silencing of the CXCR3B gene with 80 nM siCXCR3. Our results have shown that in IFN γ pre-treated, siControl transfected cells, CXCL10 significantly increased the death of melanocytes (demonstrated by increased number of yellow-immunoreactive cells in IncuCyte, Fig. 4b). This death was seen in melanocytes extracted from both healthy ($P = 0.008$) and NL vitiligo skin ($P = 0.03$) (Fig. 4c). Vitiligo melanocytes were significantly more sensitive to CXCL10-induced death compared to healthy melanocytes ($P = 0.004$), inducing ~2-fold difference in rate of melanocyte death (Fig. 4c). Transfection of melanocytes with siCXCR3 prior to CXCL10 stimulation, completely inhibited the CXCL10-induced death and restored baseline responses in both healthy ($P = 0.004$) and vitiligo ($P = 0.03$) melanocytes (also

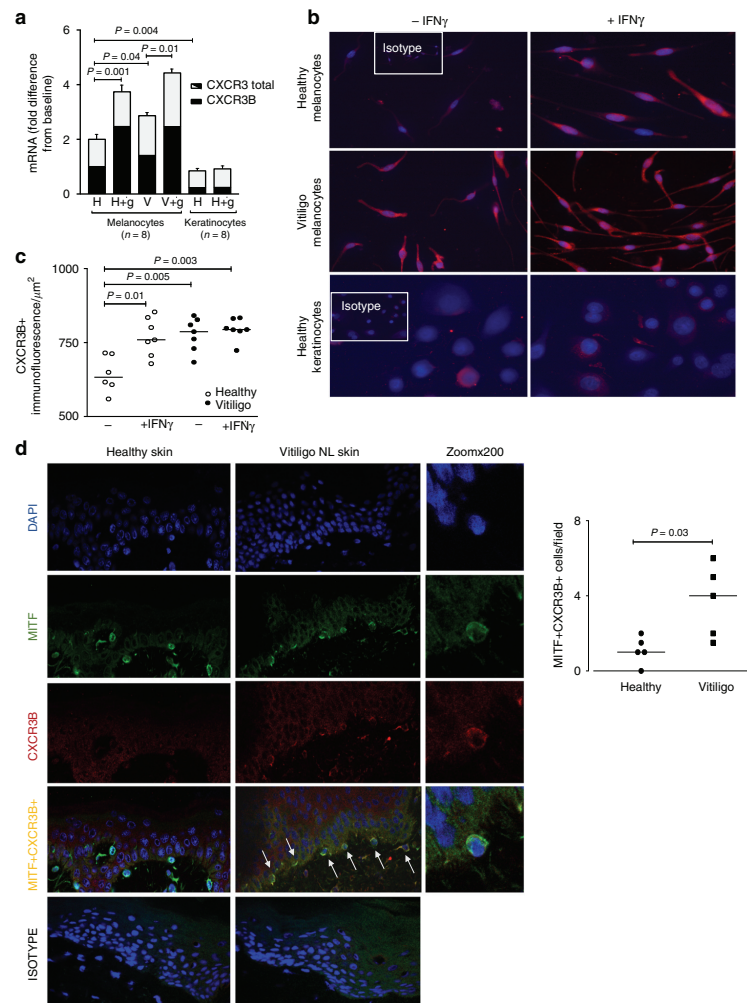
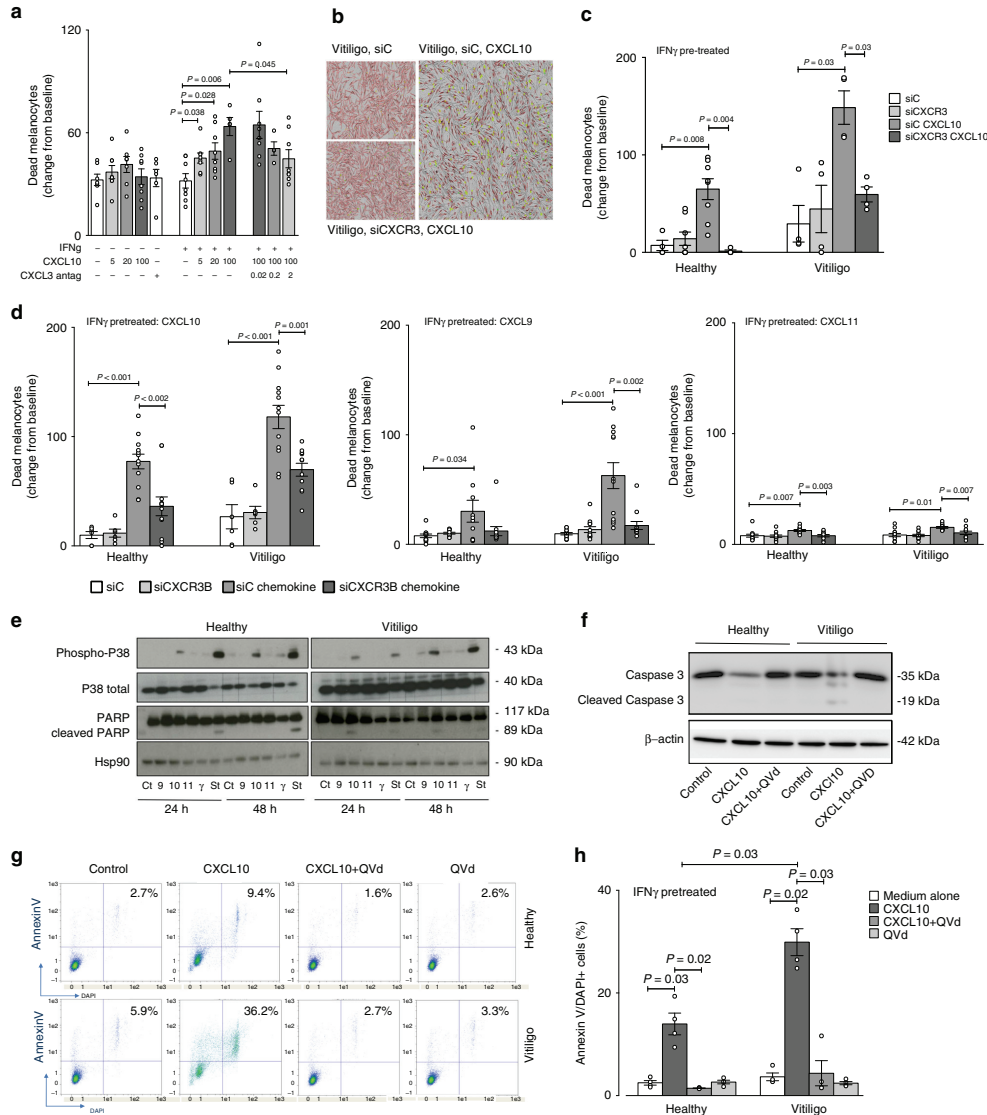


Fig. 3 Expression of CXCR3B in human melanocytes and their regulation by IFN γ . **a** Total CXCR3 mRNA (black + white bars) and CXCR3B mRNA (black bars) in healthy and vitiligo primary melanocytes ($n = 8$) and healthy keratinocytes ($n = 5$) before and after exposure to IFN γ 50 ng/ml for 24 h. Results are normalized to unstimulated melanocytes from healthy subjects and expressed as mean \pm SEM. **b** Immuno-detection of CXCR3B protein and **c** its semi-quantification in melanocytes extracted from healthy skin (open circles, $n = 6-7$) and skin from vitiligo patients (closed circles, $n = 7$) before and after IFN γ stimulation. **d** In situ detection of CXCR3B $^{+}$ melanocytes (MITF $^{+}$ CXCR3B $^{+}$) in vitiligo non-lesional (NL) skin and their quantification ($n = 5$) compared to healthy skin ($n = 5$). Results are shown as individual dot plots with a line at median

visualised in Fig. 4b by reduction in yellow-stained dead cells). To more specifically examine the contributing role of CXCR3B, we repeated this experiment in both healthy and vitiligo melanocytes using custom design specific silencer RNA directed against the CXCR3B isoform (efficiency of the SiCXCR3B at protein level shown in Supplementary Fig. 4c). Transfection of melanocytes with siCXCR3B prior to CXCL10 stimulation, significantly reduced the CXCL10-induced death in both healthy ($P = 0.002$) and vitiligo ($P = 0.001$) melanocytes (Fig. 4d). In addition to CXCL10, we examined responses to CXCL9 and CXCL11. Treatment with CXCL9 and CXCL11 also induced a significant

melanocyte death in both healthy ($P = 0.034$ and $P = 0.007$, respectively) and vitiligo ($P = P < 0.001$ and $P = 0.01$) melanocytes that was almost completely prevented by the use of SiCXCR3B (Fig. 4d). Interestingly, CXCL9-induced melanocyte death was significantly lower compared with CXCL10-induced death in both healthy ($P < 0.001$) and vitiligo ($P = 0.0035$) patients. The difference was even more pronounced with CXCL11, that induced much lower cell death compared to CXCL10 ($P < 0.001$ for both healthy and vitiligo).

It has been shown that the activation of CXCR3B in breast cancer cells activates p38 MAPK and PARP pathway, inducing



cell apoptosis³¹. Studying the signalling pathway involved in chemokine-induced CXCR3B activation in melanocytes, we have shown that in melanocytes extracted from healthy patients and not pre-treated with IFN γ , only a slight activation of p38 but not PARP cleavage was seen following chemokine stimulation (Fig. 4e). This was in contrast to vitiligo patients where we observed increased activation of p38 and PARP cleavage. In accordance to the melanocyte cell death observed using IncuCyte experiment, the activation of the pathway is mostly observed after CXCL10 treatment compared to CXCL9 or CXCL11 stimulation (Fig. 4e). CXCL10-induced changes were of the similar magnitude as those seen following stimulation with positive

control staurosporine (St), a potent pro-apoptotic therapeutic agent (Fig. 4e). Interestingly, the absence of CXCL10-induced apoptosis in NHM without IFN γ pre-treatment (Fig. 4e) while a significant apoptosis is observed when they are pre-treated with IFN γ (Fig. 4c), is in accordance with the low basal expression of CXCR3B in NHM and its increased expression after IFN γ stimulation (Fig. 3b, c). To assess the role of apoptosis in CXCL10-induced melanocyte death, in parallel we have shown cleavage of caspase-3 in vitiligo patients but not in healthy controls and this effect to be reversed by QVd-OPH, a caspase inhibitor (Fig. 4f). To further understand this CXCL10-induced death mechanism, we pre-treated healthy and vitiligo

Fig. 4 CXCL10 activates melanocytic CXCR3B to induce apoptosis. **a** Effect of CXCL10 (5, 20, 100 pg/ml) on cell viability in unstimulated or IFN γ stimulated (50 ng/ml for 48 h) melanocytes from vitiligo patients, in presence or absence of CXCR3 antagonist AS612568 (0.02 μ M, 0.2 μ M or 2 μ M) ($n = 5-8$). Cell viability was monitored using IncuCyte[®] live cell fluorescence imaging system. **b** Illustrates live IncuCyte images of vitiligo melanocytes 24 h after exposure to CXCL10 in cells transfected with siC or siCXCR3. Melanocytes were tracked with CellTracker[™] Red CMPTX dye and dead cells tracked with IncuCyte[®] Cytotox Green reagent. Co-localised yellow cells represent dead melanocytes. The effect of siCXCR3 (or its siC) on CXCL10 (100 pg/ml)-induced death of healthy ($n = 4-8$) and vitiligo ($n = 4$) melanocytes are shown in **c**. In **d** healthy and vitiligo melanocytes ($n = 6-12$) were transfected with siCXCR3B (or its siC) and melanocyte death shown at 24 h following CXCL10, CXCL9 or CXCL11 (100 pg/ml) stimulation. In separate experiments, cell lysates was used to study the signalling pathway induced by chemokines, IFN γ (50 ng/ml) or Staurosporine (positive control, 1 μ g/ml) at 24 or 48 h post stimulation, measuring the expression levels of phosphorylated and total p38 and total and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by Western Blot analysis (**e**). HSP90 was used as an internal loading control. Representative blot of 3 separate experiments is shown. Total and cleaved caspase-3 activity (**f**) and proportion of apoptotic cells (counted as % Annexin V+DAPI+ cells in FACS analysis) (**g**) from healthy ($n = 4$) and vitiligo ($n = 4$) melanocytes stimulated with 100 pg/ml CXCL10 for 24 h in presence or absence of QVd OPh (10 μ M, caspase inhibitor) (**h**). Results are shown as individual dot plots with a line at mean \pm SEM

melanocytes with IFN γ prior to CXCL10 and QVd stimulation, and using FACS, we have demonstrated CXCL10 to significantly increase the percentage of AnnexinV + DAPI+ apoptotic cells in both healthy (2.7–9.4%) and vitiligo melanocytes (5.9–36.2%) (Fig. 4g). The level of apoptosis was >3-fold greater in vitiligo ($P = 0.02$) compared to healthy cells ($P = 0.03$) and apoptosis was completely reversed by QVd in both groups ($P = 0.03$, Fig. 4g, h). IFN γ or QVd alone or CXCL10 in non IFN γ primed cells had no effect on apoptosis. It is interesting to note that as a comparison, we detected low expression of CXCR3B on CD4+ and CD8+ lymphocytes isolated from PMBCs of healthy patients (Supplementary Fig. 5a), however while CXCL10 stimulation of T cells had no effect on T cell death, CXCL10 stimulated proliferation of both CD4 and CD8 T cells (Supplementary Fig. 5b).

CXCR3B-induced melanocyte death triggers adaptive immunity. To examine whether CXCR3B-induced melanocyte death following pre-treatment with IFN γ and stimulation with CXCL10 may initiate adaptive melanocyte auto-immunity by their own presentation of antigens, we replenished media post CXCL10 stimulation and 3 days later stimulated melanocytes with their *autologous* T cells. Our IncuCyte[®] results have shown that there was significantly higher melanocyte death when T cells were present with CXCL10-stimulated melanocytes compared to melanocyte death seen with CXCL10 stimulation alone ($P = 0.02$) or addition of T cells alone ($P = 0.02$) (Fig. 5a). These results were reproducible and were of the similar magnitude as seen following stimulation of melanocytes with *allogenic* T cells (Supplementary Fig. 6). Interestingly, pre-incubation of T cells with CXCL10 for 24 h, prior to their addition to IFN γ -primed melanocytes did not induce melanocyte death while the same T cells added to IFN γ -primed melanocytes treated with CXCL10 did suggesting lack of direct effect of CXCL10 on the T cells (Supplementary Fig. 7). T cell enhanced melanocyte death in IFN γ -primed melanocytes was accompanied by increased melanocyte expression of co-stimulatory (CD40, CD80, HLA-DR) and adhesion (ICAM-1) molecules (Fig. 5b) and parallel increase in absolute number of CD3+ T cells in IncuCyte co-cultures with time ($P = 0.03$) (Fig. 5c). These CD3+ T cells were indeed shown to be Ki67+ proliferating cells (Fig. 5d). These data are supported by flow cytometric quantification of T cell proliferation which showed an increased number of dividing T cells (evaluated as %CD3+CFSE+ cells) when they were co-cultured with IFN γ -primed NHM stimulated with CXCL10 and responses were similar to that seen following PHA stimulation (Fig. 5e). This degree of proliferation was not seen when T cells were co-cultured with non-primed NHM exposed to CXCL10. Treatment with CXCR3 antagonist prevented the potentiating effect of T cells on CXCL10-induced melanocyte death ($P = 0.008$) (Fig. 5a), augmentation of T cell number ($P = 0.04$) (Fig. 5c) and T cell proliferation (Fig. 5d, e).

Discussion

Here we confirm the previously reported increased level of NK cells in the blood of vitiligo patients¹⁶, and extend it to ILC1. Our transcriptome data further suggest that NK and ILC1 cells are also increased in NL skin of vitiligo patients. Interestingly, this subtype is associated with the Th1 response which is known to be the key adaptive pathway in vitiligo^{7,13}. When these cells are cultured under stress conditions, they produce IFN γ which induces CXCLs production. Here we show that NK and ILCs from vitiligo patients produce higher amount of IFN γ under oxidative stress but also under the stimulation of the two main DAMPs implicated in vitiligo pathophysiology, namely HSP70 and HMGB1 compared to healthy subjects. Thus, not only vitiligo patients have an increased population of NK and ILC1 in their skin and their blood, but these cells are more sensitive to DAMPs compared to healthy individuals.

It has been previously shown that skin memory T regulatory cells express CXCR3, that these cells are expressed in vitiligo skin during the depigmenting process and they remain in the skin even after repigmentation³². Those cells can be an important source of IFN γ production and their presence in repigmented areas could explain the recurrences of vitiligo lesions which often affected the same skin locations. However, skin memory T regulatory cells need that the adaptive immunity occurs to be recruited and thus can't be the initial source of IFN γ production. Thus, they can't explain the initial steps that lead to the recruitment and activation of T cells against melanocytes and the development of the first clinical lesions. NK and ILC1 cells are potent producer of IFN γ under endogenous or exogenous stress conditions. Their significant increase in the blood and in the NL vitiligo skin argues for their key role in the initial production of IFN γ . Importantly, we showed that melanocytes express CXCR3, more particularly the CXCR3B isoform. Also known as G protein-coupled receptor 9 (GPR9), CD183, P-10 receptor, and MIG receptor, CXCR3 is a chemokine receptor expressed on autoreactive T cells that have been implicated in a range of physiological processes and related disorders. CXCR3 is largely absent from naive T cells but is upregulated upon activation with antigen and recruits activated cells to sites of tissue inflammation in response to its primary ligands: CXCL9, CXCL10, and CXCL11. CXCL9 and CXCL10 are strongly produced in many autoimmune and inflammatory diseases leading to the accumulation of CXCR3+T cells with Th1 phenotypes³³. CXCR3 has three isoforms in human: CXCR3A, CXCR3B and CXCR3Alt³⁴. Importantly, the isoform B is absent in rodents therefore the expression nor the role of CXCR3B could be investigated in vitiligo animal models, thus requiring to be studying in human samples. The isoform CXCR3A is expressed by T lymphocytes and has an important role in the adaptive immune system³⁰. CXCR3A activation induces differentiation and proliferation.

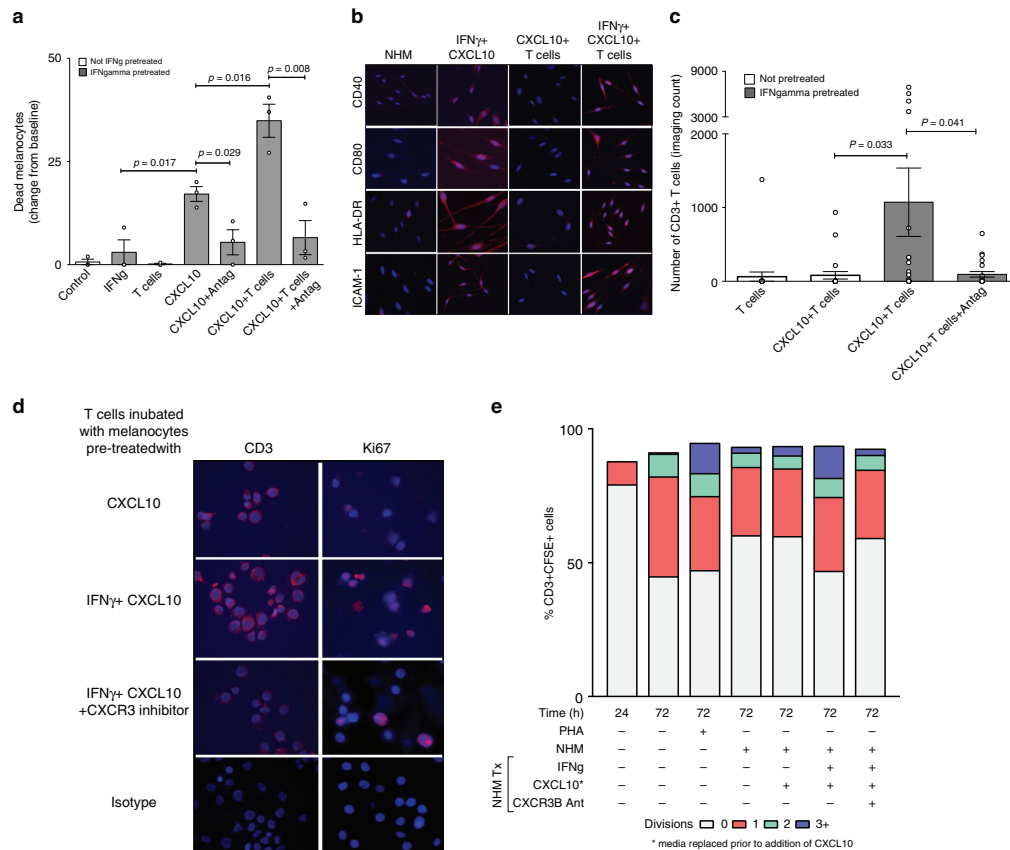


Fig. 5 T cells enhance CXCL10-induced melanocyte death by induction of adaptive immunity. **a** CXCL10-induced death of vitiligo melanocytes in presence or absence of patients own *autologous* T cells. As above, IFN γ -pretreated melanocytes were exposed to CXCL10 in presence or absence of CXCR3 antagonist AS612568 (2 μ M). The next day, media was replaced and 3 days later patient's own CD3+ T cell were sorted and added to the melanocytes ($n = 3$) prior to initiation of IncuCyte. **b** At the end of the experiment (~48 h), supernatant was collected, remaining cells trypsinised and cytospin sections prepared for immunofluorescence detection of co-stimulatory (CD40, CD80, HLA-DR) and adhesion (ICAM-1) molecules on melanocytes. **c** T cell-induced potentiation of melanocyte death in IFN γ -pretreated melanocytes (compared to untreated melanocytes) was associated with a parallel increase in the number of CD3+ T cells which was supported by increased expression of Ki67+ cells in the same cytospin sections. **d** Results are shown as individual dot plots with a line at mean \pm SEM. **e** T cell proliferation was quantified by flow analysis measuring the percentage of CD3+CFSE+ cells undergoing 0, 1, 2 or 3+ divisions ($n = 3$). Labelled cells at time zero was used as a negative reference, unstimulated cells left in culture for 72 h before labelling as a control and cells stimulated with PHA for 72 h (Phytohemagglutinin, 5 μ g/ml) as a positive control

CXCR3B is only marginally expressed at the surface of immune cells and its activation induces apoptosis. We show here that CXCR3B expression is low at baseline in melanocytes extracted from healthy subjects and increases under IFN γ stimulation. Melanocytes from vitiligo patients have elevated basal expression of CXCR3B. Interestingly, we also observed a significant increase in CXCR3B expression in melanocytes from NL skin of vitiligo patients compared to the skin of healthy volunteers, reinforcing the data showing that melanocytes from vitiligo patients have intrinsic defects¹⁹. We demonstrate that CXCL10 activates the downstream pathway of CXCR3B in melanocytes of vitiligo patients, leading to their apoptosis. CXCL9, and in a much lesser extent CXCL11, are also able to induce some CXCR3B-induced apoptosis of melanocytes, but in a much less effective manner

compared to CXCL10. It has previously been demonstrated that CXCL10 has a much greater binding affinity for CXCR3B compared to CXCL9 or CXCL11 while the affinity is similar between the three chemokines for the CXCR3A isoform³⁵. This may be attributed to differences in special conformation between CXCR3A and CXCR3B³⁶.

We show that CXCL10-induced apoptosis occurs to a greater extent in melanocytes extracted from vitiligo patients and that this apoptosis can be prevented by using CXCR3 antagonists, by silencing CXCR3B, or by using caspase-inhibitors. Few data are available on the expression and the role of CXCR3B in non-immune cells, however CXCL10 was shown to inhibit angiogenesis by activating CXCR3B at the surface of endothelial cells and inducing their apoptosis³⁷. We further demonstrate that

under IFN γ and CXCL10 stimulation, several vitiligo melanocytes undergo apoptosis when the remaining ones become activated expressing CD40, CD80, HLA-DR (MHC-II) and ICAM-1 at their surface and present their own antigens, subsequently triggering T cell proliferation and the onset of the adaptive response by the lymphocytes. The fact that melanocytes may become antigen presenting cells upon IFN γ stimulation was suggested years ago²¹. We show here that not only vitiligo melanocytes undergo initial apoptosis through the CXCR3B activation at their surface but may also be the presenting cells that initiate the adaptive response against themselves. This CXCR3B-induced apoptosis that occurs before T cells are attracted could also explain the reduced number of melanocytes that is observed in NL vitiligo skin³⁸. Thus, both phenotypically normal melanocytes as well as NK and ILC cells from vitiligo patients respond differently to various stimuli when compared to cells from healthy donors. These data suggest that all these cells harbour genetic abnormalities. These results are in accordance with the genetic studies which reported allelic variations in innate and adaptive immune genes but also in melanocytic genes³⁹.

Taken together, our results shed light on the initial events that trigger the anti-melanocyte auto-immunity and give light to the melanocytes as a central player in the initiation of this process. Upon endogenous or exogenous stress, NK and ILC1 produce IFN γ that induce the production of chemokines by not only keratinocytes but by melanocytes. These chemokines attract and activate T cells and furthermore, CXCL10 induces the initial apoptosis of some melanocytes resulting in release of auto-antigens. Activated by the local production of IFN γ , the remaining melanocytes express co-stimulatory molecules (CD40, CD80, MHC-II, ICAM-1) and present their own antigens to the T cells attracted by the chemokines and initiate the adaptive response (Fig. 6). These results emphasize the key role of CXCR3B in the initial apoptosis of melanocytes and identify this receptor as a target to prevent and to treat vitiligo by acting at the very early steps in the destruction of melanocytes.

Methods

Biological samples and experimental outline. A total of 21 subjects were recruited for this study (Table 1). Fourteen vitiligo patients ($n = 14$) with stable disease were enrolled (Department of Dermatology, L'Archet Hospital, CHU Nice) after informed, written consent was obtained. Eight healthy controls ($n = 8$) were recruited from the same clinic who were surveilled for skin cancer (suspicious biopsy or familiar history) but were negative on examination. The two groups were matched for gender, age, and location. The study was approved by the National ethics committee (N12.034). From each vitiligo patient, we obtained 3 \times 4-mm skin punch biopsies (1 lesional, L and 2 non-lesional, NL) and for each healthy control 2 NL biopsies. Fifty (50) ml of blood was obtained from all subjects. L and NL skin was processed for immunohistochemistry and the remaining NL biopsy used to extract primary melanocyte from the skin which were then propagated *in vitro*. Blood was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by Ficoll gradient centrifugation (Lymphoprep[®], Euromedex, France). Ten million PBMCs were used immediately for FACS analysis to examine the phenotype and frequency of NK/ILC in the blood (for markers see below). The remainder of PBMCs (30–40 \times 10⁶) were frozen down in FCS 10% DMSO and kept at -156°C for subsequent sorting of NK/ILC populations and co-culturing with patients own *autologous* primary melanocytes extracted from their skin biopsies. Propagation of primary melanocytes *in vitro* takes 2–3 months to obtain sufficient number of melanocytes required for the experiment.

Immunofluorescence and immunohistochemistry. One L and NL skin biopsy from each patient was embedded in Tissue-Tek[®] O.C.T medium in cryomolds (Sakura Finetek, USA), snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (2-methyl butane) and stored at -80°C before cutting. Tissue was cut with microtome into 7 μm sections and fixed on Superfrost Plus slides. After 20 min of air-drying, sections were fixed in ice-cold acetone (30 min at -20°C) and saturated for 2 h at RT with PBS 5% BSA 3% normal goat serum. For detection of Granzyme B+ NK cells and IFN γ -producing NK cells, we incubated sections overnight at 4°C with specific primary antibodies directed against human CD3, CD56, Granzyme B or IFN γ (Abcam and all used at 1:100). The next day the signal was revealed by incubating for 1 h at RT with secondary antibodies conjugated to

fluorochromogens (1:1000) and slides mounted with Prolong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (ThermoFisher). CD3-CD56+ NK cells were visualized as red immunostained cells, Granzyme B and IFN γ as green and yellow as co-localised NK cells containing Granzyme B or IFN γ . In isotype controls, the primary antibody was omitted. To confirm immunofluorescence results, skin slides were stained with immunohistochemical markers directed against human CD3, CD56 and Granzyme B using automated staining protocols (Dako Autostainer Link 47) and results were interpreted by pathologist Dr. Nathalie Cardot-Leccia (Pasteur Hospital, CHU Nice). *In situ* ILC1 population was detected using anti-human CD161 (green) (Novus Biological, US) and anti-Tbet (BioLegend, London, UK) (red) with the use of True-Nuclear[®] Transcription Factor Buffer Set (Biolegend) for nuclear staining. CD161 + Tbet+ cells were visualized as red and confirmed to be CD3, CD19 and CD14 negative but CD127+. Semi-quantitative analysis of all immunofluorescence images and positive immunoreactive cells were counted over 10 non-overlapping fields in 5–8 patients/group using either Nikon A1R confocal microscope or Leica microscope, both at 40 \times objective.

FACS analysis of NK and ILC populations in the blood. Total NKs were defined as CD3-CD56+ cells. Cytotoxic or cytokine-producing NKs were differentiated based on their additional CD16 expression whereby CD56^{bright} CD16^{dim} cells are cytokine producing NKs and CD56^{dim} CD16^{bright} are cytotoxic NK cells. Gating strategy for ILC subpopulations initially involved gating all live PBMCs for negative Lineage selection (to exclude CD3+ T cells, CD19+ B cells, CD14+ macrophages, CD34+ eosinophil progenitors, CD123+ dendritic cells and TCR). Lin- cells were then selected for CD127 positivity which stains for all ILCs but not NK cells which are CD127-. Finally, CD117 (c-kit) and CRTh2 (prostaglandin D2 receptor, CD294) markers were used to delineate between the 3 ILC subclasses whereby ILC1 were defined as Lin-CD127 + CRTh2-CD117-, ILC2 as Lin-CD127 + CRTh2 + CD117+ and ILC3 as Lin-CD127 + CRTh2-CD117+ cells. All antibodies were purchased from Miltenyi (Paris, France). Gating strategies are shown in Supplementary Fig. 1.

Isolation of primary human melanocytes. On arrival, skin biopsies were rinsed in 70% ethanol followed by 2 \times PBS 1% Antibiotic-Antimycotic solution (Gibco), prior to dissociation of dermal-epidermal junctions by overnight digestion in a Dispase solution (Life Technologies) at 4°C . The next day, dermis was discarded and epidermis digested in a trypsin/EDTA solution for 20 min at 37°C . Cellular suspension was passed through a 70 μm filter and melanocytes re-suspended in MCDB 153 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; Perbio, Cramlington, UK), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (Sigma-Aldrich), 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 16 nM tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Sigma-Aldrich), 1 ng/ml fibroblast growth factor (FGF; Pro-mega, Madison, WI, USA), 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine pituitary extract (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and 10 μM forskolin (Sigma-Aldrich). Melanocytes were maintained at 37°C in 95% O₂/5% CO₂ atmosphere and supplemented with 0.08% G418 geneticin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Invitrogen) for \sim 2 weeks to eliminate rapidly growing cells (i.e., keratinocytes hence selecting for melanocyte propagation). Once selected, melanocytes were grown in Cascade Biologics 254 medium (ThermoFisher Scientific) with Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS, Gibco).

Response of NK and ILCs to stress. NK and total ILC were sorted (SH800S Cell Sorter, Sony Biotechnology) from PBMC of healthy and vitiligo patients using the same strategy as for FACS analysis (Supplementary Fig. 1). Sorted NKs were plated in round-bottom 96-well plates in RPMI 10% FCS prior to stimulation with three different stress-inducing DAMP molecules including H₂O₂ (0.1, 1, 10 μM) (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon France), HMGB1 (250, 500 or 1000 ng/ml) or HSP70 (TKD peptide at 250, 750 or 1500 ng/ml) (both from Abcam, Cambridge, UK). Supernatant was collected at 24, 48 or 72 h post stimulation. IFN γ and chemokine (CXCL9, CXCL10 and CXCL11) production was measured using commercially available ELISA kits (PeprTech, NJ, USA).

Response of melanocytes and keratinocytes to exogenous IFN γ . NHM and NHK were isolated from neonatal foreskin obtained after circumcision as previously described. Cells were stimulated with IFN γ (50 ng/ml, Miltenyi Biotec) for 24 h. Cell pellets were harvested for extraction of RNA (using RNeasy kits, Qiagen) and 1 μg RNA used to synthesize cDNA using the Reverse Transcription System (Promega) which was then used as a template for amplification by real-time qPCR with Sybr[™] Green reagent (Life Technologies, CA, USA) and specific primers directed against CXCL4, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 genes. All measurements were performed in triplicate and results normalized to the expression of the SB34 housekeeping gene. In separate experiments, primary melanocytes from healthy and vitiligo skin biopsies were also stimulated with IFN γ and 24 h later both cell pellets and supernatants were collected for measurement of chemokine production at mRNA and protein level.

ILC and melanocyte co-culture. The supernatant from the NKs and total ILCs which were previously sorted from PBMCs and stressed with 1 μM H₂O₂ for 48 h was replaced with fresh media prior to cells being directly added to their own primary *autologous* healthy or vitiligo melanocytes. Melanocytes were also

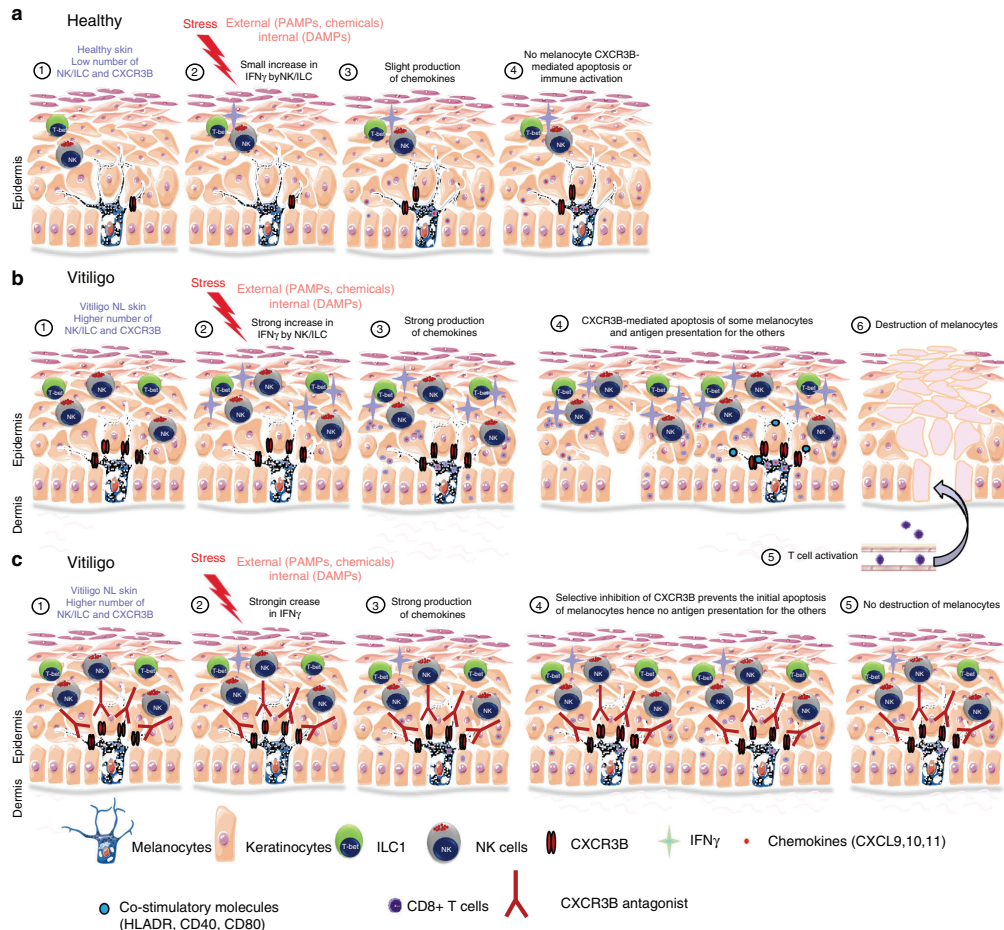


Fig. 6 Initial steps in the anti-melanocytic immune activation in vitiligo. **a** Schematic representation of normal skin. A low number of NK and ILC1 cells are present in the skin. External stress on the skin induces only a small increase in IFN γ by NK/ILC which is not sufficient to initiate their chemokines production, hence not initiating melanocyte apoptosis or immune activation. **b** Schematic representation of vitiligo skin. The basal number of NK and ILC1 cells is increased. Damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules of genetically predisposed melanocytes can activate ILC1 and NK (1). Alternatively, ILC1 and NK can be also activated by external stress and pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMP) (2). These NK and ILC cells are more sensitive to stress compared to healthy individuals and in response, they produce large amount of IFN γ (2) that induces the secretion of chemokines by keratinocytes and to a lesser extent by melanocytes (3). These chemokines (mostly CXCL10), bind chemokine receptor CXCR3B at the surface of melanocytes and induces their initial apoptosis and release of melanocytic antigens. The remaining melanocytes stimulated by IFN γ express co-stimulatory (CD40, CD80, HLA-DR) and adhesion (ICAM-1) molecules and start presenting their own antigens to the naive T cells attracted by the chemokines (5), thus initiating the initial steps involved in anti-melanocytic immunity in the skin (6). **c** Schematic representation of vitiligo skin treated with a selective inhibition of the B isoform of CXCR3. DAMPs and PAMPs induce a strong production of IFN γ by NK and ILC1 cells followed by a potent production of chemokines. However, the selective inhibition of CXCR3B prevents the initial melanocytic apoptosis and subsequent presentation of melanocytic antigens without impairing T cell function

incubated with *autologous* non-stressed NKs or total ILCs as controls. Positive controls were wells directly stimulated *ex vivo* with 50 ng/ml IFN γ . Supernatant was collected 24 h post incubation with innate cells or IFN γ to measure melanocyte production of CXCL9, CXCL10, CXCL11 and IFN γ by ELISA.

Detection of CXCR3B on human melanocytes. Melanocytes from healthy and vitiligo subjects were stimulated with 50 ng/ml IFN γ for 24 h and cell pellets harvested for RNA extraction. Real-time qPCR was performed using specific

primers directed against CXCR3 total or against CXCR3B and results normalized to the house-keeping gene SB 34 (Supplementary Table 1). CXCR3B mRNA levels were compared to expression in healthy human keratinocytes at baseline and following IFN γ stimulation. In separate experiments, melanocytes and keratinocytes were grown on cover slides in 12-well plates and stimulated with IFN γ as above. Twenty-four hours later, they were fixed with 1% paraformaldehyde, saturated in PBS 3% BSA containing 3% goat serum for 1 h and incubated overnight at 4 °C with primary antibody directed against CXCR3B (1:200) (Proteintech, USA). The next day, slides were washed 3x with PBS 3% BSA 0.1% Tween20 prior

to incubation for 1 h with secondary antibody (goat anti mouse AF594, 1:1000 at RT) and mounted with Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (ThermoFisher, Waltham, USA). The number of CXCR3B+ immunoreactive cells (red) were counted over 10 non-overlapping fields and expressed as CXCR3B+ immunofluorescence per μm^2 . For in situ detection of CXCR3B+ melanocytes in the human skin, OCT frozen sections were permeabilised with PBS 0.3% Triton™ X-100 (Abcam, France) for 10 min prior to saturation with PBS 5% BSA 10% normal goat serum and 0.05% Triton™ X-100 for 2 h at RT. Slides were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (polyclonal anti-MITF, 1:50, Sigma Aldrich and monoclonal anti-CXCR3B, 1:50, Proteintech) and the next day 1 h with secondary antibodies (anti-mouse AF594 and anti-rabbit AF488, both 1:1000) prior to mounting the slides and visualizing under confocal microscope (Nikon AIR using a x60 objective. For each slide (5 subjects per group), the number of MITF+CXCR3B+ cells (yellow immunostaining) were counted and averaged over six non-overlapping fields. CXCR3B staining in melanocytes was confirmed using another melanocyte marker gp100 (PMEL, premelanosome protein, 1:200, Abcam).

Live imaging of melanocyte viability and proliferation. Melanocytes were plated in 96-well plates (10,000/well) and stimulated with 50 ng/ml IFN γ for 48 h prior to transfection with 50 or 80 nM siCXCR3 or siC (SmartPool scramble sequence siRNA, Dharmacon, France) or with 80 nM custom-designed siCXCR3B or siC (ThermoFisher, France) using Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen, France) in optiMEM medium (Invitrogen). Next day, media was replaced and melanocytes stained with CellTracker™ Red CMPTX dye for 20 min at 37°C (1 μM , Molecular Probes, USA) before addition of 100 pg/ml recombinant human CXCL9, CXCL10 or CXCL11 (PeproTech) to melanocytes. Finally, IncuCyte™ green Cytotox Reagent (100 nM, Essen Bioscience, Michigan, USA) was added to all wells and melanocyte death monitored in real-time using IncuCyte™ Zoom live-cell imaging system (Essen Biosciences) which was inside a 37°C humidified CO $_2$ incubator scanning the plate every 2 h. Multiple images were collected per well and quantification of dead melanocytes (yellow co-localised cells) was analysed using the integrated Zoom™ software. In separate experiments, non-transfected cells were pre-incubated with IFN γ and 48 h later treated with CXCR3 antagonist AS612568 (0.02, 0.2, 2 μM , Calbiochem, China) and Cytotox™ Reagent added just before live imaging. To try and mimic an in vivo situation, vitiligo melanocytes were stimulated with IFN γ (to upregulate their CD40 and CXCR3B expression) and 48 h later stimulated with CXCL10 (100 pg/ml). The next day, supernatant was removed and replaced with fresh media. In separate experiments, 24 h post CXCL10 stimulation, all media was replaced and melanocytes left in culture for another 72 h before adding either allogeneic PBMC (positive control experiments) or autologous non-stimulated and sorted CD3+ T cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) prior to IncuCyte live imaging. At the end of the experiment (~40 h later), remaining melanocytes were trypsinized and co-stimulatory (CD40, HLA-DR, CD80) and adhesion cell markers (ICAM-1) on melanocytes, as well as proliferating T cells (CD3+ and Ki67+) were examined by immunofluorescence staining of cytospin sections. Monoclonal antibodies directed against human CD40 (G28.5, 1:100), HLA-DR (TU36, 1:200), CD80 (L307.4, 1:50) and ICAM-1 (HA58, 1:400) were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Ki67 rabbit monoclonal antibody (SP6, 1:200) was purchased from Abcam (Cambridge, UK). The number of CD3+ T cells in IncuCyte was counted from time-lapse images with Fiji software using a macro whereby a median filter was initially applied prior to application of 'Find Maxima' function to identify and count all non-stained dark spots in the images. Quantification of proliferation was performed using flow cytometry and CellTrace CFSE cell proliferation kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Briefly, 1×10^6 cells were labelled with 5 μM of CFSE in 96-well plates and 72 h later, cells collected, stained with anti-CD3 conjugated to APC (BD Biosciences, 1:100) and fluorescence measured with MACSQuant Analyzer (Miltenyi, Paris, France). Labelled cells at time zero was used as a negative reference, unstimulated cells left in culture for 72 h before labelling as a control and cells stimulated with PHA for 72 h (Phytohemagglutinin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as a positive control.

CXCL10-induced signalling in healthy and vitiligo melanocytes. Protein samples from primary melanocytes stimulated with CXCL9, CXCL10, CXCL11 (100 pg/ml) or IFN γ (50 ng/ml) for 24 h were extracted in buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 15 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100 and 1 \times protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates (30 mg) were separated on SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp). The membranes were incubated with antibodies directed against total and active p38 and poly ADP-ribose polymerase (PARP) (Cell Signalling Technology, 1:1000) followed by peroxidase-linked secondary antibodies. HSP90 was used as house-keeping genes. Reactive protein bands were detected using chemiluminescent substrate (ECL System, Amersham) and Fujifilm LAS-4000 system. Staurosporine (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used as a positive control. In parallel experiments, to confirm the role of apoptosis in CXCL10-induced melanocyte death, cells were pretreated with IFN γ and stimulated with CXCL10 (100 pg/ml) in presence of absence of QVD OPH (10 μM , caspase inhibitor, Biosciences) for 24 h. Cell lysates were prepared for assessment of total and cleaved Caspase-3 activity (Cell Signalling Technology, 1:1000) by WB and remaining cells stained with Annexin V conjugate (Miltenyi, France) and DAPI for FACS analysis.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with Graphpad Prism® 6 software. Mann-Whitney non-parametric analysis was used to test unpaired differences between groups and Wilcoxon signed rank test for paired differences. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 27 September 2018 Accepted: 5 April 2019

Published online: 16 May 2019

References

1. Spritz, R. A. Six decades of vitiligo genetics: genome-wide studies provide insights into autoimmune pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 268–273 (2012).
2. Jin, Y. et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat. Genet.* **44**, 676–680 (2012).
3. Jin, Y. et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. *Nat. Genet.* **48**, 1418–1424 (2016).
4. Chatterjee, S. et al. A quantitative increase in regulatory T cells controls development of vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1285–1294 (2014).
5. Mosenson, J. A. et al. Mutant HSP70 reverses autoimmune depigmentation in vitiligo. *Sci. Transl. Med.* **5**, 174ra128 (2013).
6. Harris, J. E. et al. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN-gamma for autoreactive CD8(+) T-cell accumulation in the skin. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1869–1876 (2012).
7. Rashighi, M. et al. CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo. *Sci. Transl. Med.* **6**, 223ra223 (2014).
8. Richmond, J. M. et al. Keratinocyte-derived chemokines orchestrate T cell positioning in the epidermis during vitiligo and may serve as biomarkers of disease. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 350–358 (2017).
9. Wang, X. X. et al. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **174**, 1318–1326 (2016).
10. Richmond, J. M. et al. CXCR3 depleting antibodies prevent and reverse vitiligo in mice. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 982–985 (2017).
11. Regazzetti, C. et al. Transcriptional analysis of vitiligo skin reveals the alteration of WNT pathway: a promising target for repigmenting vitiligo patients. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 3105–3114 (2015).
12. Yu, R. et al. Transcriptome analysis reveals markers of aberrantly activated innate immunity in vitiligo lesional and non-lesional skin. *PLoS ONE* **7**, e51040 (2012).
13. Sonnenberg, G. F. & Artis, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat. Med.* **21**, 698–708 (2015).
14. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
15. Bernardini, G., Gismondi, A. & Santoni, A. Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. *Immunol. Lett.* **145**, 39–46 (2012).
16. Halder, R. M., Walters, C. S., Johnson, B. A., Chakrabarti, S. G. & Kenney, J. A. Jr. Aberrations in T lymphocytes and natural killer cells in vitiligo: a flow cytometric study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **14**, 733–737 (1986).
17. Bruggen, M. C. et al. In situ mapping of innate lymphoid cells in human skin: evidence for remarkable differences between normal and inflamed skin. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 2396–2405 (2016).
18. Simoni, Y. et al. Human innate lymphoid cell subsets possess tissue-type based heterogeneity in phenotype and frequency. *Immunity* **46**, 148–161 (2017).
19. Richmond, J. M., Frisoli, M. L. & Harris, J. E. Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 676–682 (2013).
20. Le Poole, I. C. et al. A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J. Immunol.* **151**, 7284–7292 (1993).
21. Lu, Y., Zhu, W. Y., Tan, C., Yu, G. H. & Gu, J. X. Melanocytes are potential immunocompetent cells: evidence from recognition of immunological characteristics of cultured human melanocytes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **15**, 454–460 (2002).
22. Yang, Y. et al. A similar local immune and oxidative stress phenotype in vitiligo and halo nevus. *J. Dermatol. Sci.* **87**, 50–59 (2017).
23. Harmelin, Y. et al. Localized depigmentation on genital melanosis: a clue for the understanding of vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **168**, 663–664 (2013).
24. Vely, F. et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat. Immunol.* **17**, 1291–1299 (2016).

25. Schallreuter, K. U. et al. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J. Invest. Dermatol Symp. Proc.* **4**, 91–96 (1999).
26. Jian, Z. et al. Impaired activation of the Nrf2-ARE signaling pathway undermines H₂O₂-induced oxidative stress response: a possible mechanism for melanocyte degeneration in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2221–2230 (2014).
27. Denman, C. J. et al. HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2041–2048 (2008).
28. Mosenson, J. A. et al. Preferential secretion of inducible HSP70 by vitiligo melanocytes under stress. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 209–220 (2014).
29. Kim, J. Y., Lee, E. J., Seo, J. & Oh, S. H. Impact of high-mobility group box 1 on melanocytic survival and its involvement in the pathogenesis of vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **176**, 1558–1568 (2017).
30. Korniejewska, A., McKnight, A. J., Johnson, Z., Watson, M. L. & Ward, S. G. Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes. *Immunology* **132**, 503–515 (2011).
31. Balan, M. & Pal, S. A novel CXCR3-B chemokine receptor-induced growth-inhibitory signal in cancer cells is mediated through the regulation of Bach-1 protein and Nrf2 protein nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* **289**, 3126–3137 (2014).
32. Boniface, K. et al. Vitiligo skin is imprinted with resident memory CD8 T cells expressing CXCR3. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 355–364 (2018).
33. Kuo, P. T. et al. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Front. Med.* **5**, 271 (2018).
34. Berchiche, Y. A. & Sakmar, T. P. CXC chemokine receptor 3 alternative splice variants selectively activate different signaling pathways. *Mol. Pharm.* **90**, 483–495 (2016).
35. Lasagni, L. et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* **197**, 1537–1549 (2003).
36. Boye, K., Billottet, C., Pujol, N., Alves, I. D. & Bikfalvi, A. Ligand activation induces different conformational changes in CXCR3 receptor isoforms as evidenced by plasmon waveguide resonance (PWR). *Sci. Rep.* **7**, 10703 (2017).
37. Feldman, E. D. et al. Interferon gamma-inducible protein 10 selectively inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 125–133 (2006).
38. Wagner, R. Y. et al. Altered E-cadherin levels and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1810–1819 (2015).
39. Spritz, R. A. & Andersen, G. H. Genetics of vitiligo. *Dermatol Clin.* **35**, 245–255 (2017).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M INSERM U1065) microscopy and imaging facility, particularly the expertise of platform

manager Maéva Gesson. IneuCyte was available with financial support from ITMO Cancer Aviesan (Alliance National pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan. Special acknowledgements to Sonia Amroune and Raja Bahroumi for their assistance in the clinic with patient recruitment. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Author Contributions

M.K.T. conceived and performed the experiments and wrote the manuscript. E.C. was a Master 2 student on this project. Y.C., A.J. and C.L. assisted with cell sorting and FACS analyses and provided intellectual input. N.C.L. performed and interpreted IHC analysis. P.A., H.H.B., L.S. and C.L. performed the Western blot analyses. C.R., L.S., M.G., G.E.B. and C.P. provided technical assistance and support. A.K. helped collecting patient and control samples. Y.C., A.J., C.L., R.B., C.B. and S.R. provided expertise and feedback on manuscript draft. T.P. conceived experiments, supervised the study and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09963-8>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* would like to thank Vitali Alexeev and other anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer review reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



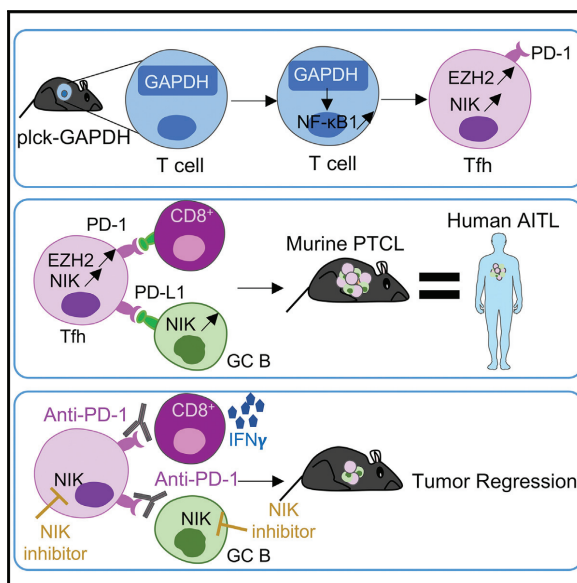
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Cancer Cell

GAPDH Overexpression in the T Cell Lineage Promotes Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma through an NF- κ B-Dependent Mechanism

Graphical Abstract



Authors

Laura Mondragón, Rana Mhaidly, Gian Marco De Donatis, ..., Thierry Passeron, Jean-Ehrlend Ricci, Els Verhoeyen

Correspondence

els.verhoeyen@unice.fr (E.V.), ricci@unice.fr (J.-E.R.)

In Brief

Mondragón et al. find that transgenic mice overexpressing GAPDH in T cells develop lymphoma that recapitulates key features of human angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL), including activation of the non-canonical NF- κ B pathway. Blocking NF- κ B activity with an NIK inhibitor reduces human and mouse AITL growth.

Highlights

- Overexpression of GAPDH in T cell lineage in a mouse model recapitulates AITL disease
- AITL tumors are characterized by a GAPDH induction of the NF- κ B pathway
- plck-GAPDH mice allow to model AITL disease for testing of new therapeutic strategies



Mondragón et al., 2019, *Cancer Cell* 36, 268–287
September 16, 2019 © 2019 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.008>

CellPress

GAPDH Overexpression in the T Cell Lineage Promotes Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma through an NF- κ B-Dependent Mechanism

Laura Mondragón,^{1,16} Rana Mhaidly,^{1,16} Gian Marco De Donatis,¹ Marie Tosolini,² Pascal Dao,³ Anthony R. Martin,³ Caroline Pons,¹ Johanna Chiche,¹ Marie Jacquin,¹ Véronique Imbert,¹ Emma Proïcs,¹ Laurent Boyer,¹ Anne Doye,¹ Frédéric Luciano,¹ Jaap G. Neels,¹ Frédéric Coutant,^{4,5} Nicole Fabien,⁴ Laura Sormani,¹ Camila Rubio-Patiño,¹ Jozef P. Bossowski,¹ Florian Muller,¹ Sandrine Marchetti,¹ Elodie Villa,¹ Jean-François Peyron,¹ Philippe Gaulard,^{6,13} François Lemonnier,^{6,7} Vahid Asnafi,⁸ Laurent Genestier,⁹ Rachid Benhida,³ Jean-Jacques Fournié,^{10,14} Thierry Passeron,^{1,11} Jean-Ehrland Ricci,^{1,15,*} and Els Verhoeyen^{1,12,15,17,*}

¹Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France

²Pôle Technologique du CRCT – Plateau Bioinformatique INSERM-UMR 1037, Toulouse, France

³Institut de Chimie de Nice UMR UNS-CNRS 7272, Université Nice Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice, France

⁴Immunology Department, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

⁵Immunogenomics and Inflammation Research Unit EA 4130, University of Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

⁶Université Paris-Est Créteil, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, Créteil, France

⁷Unité hémopathies lymphoïdes, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Créteil, France

⁸Université Paris 5, Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut National de Recherche Médicale (INSERM) U1151, and Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

⁹CRCL, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Faculté de Médecine Lyon Sud, Université Claude Bernard Lyon I, 69921 Oullins Cedex, France

¹⁰CRCT, INSERM U1037 – Université Paul Sabatier – CNRS ERL5294, Université de Toulouse, Laboratoire d'Excellence TOUCAN,

Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie CAPTOR, Toulouse, France

¹¹Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Department of Dermatology, 06204 Nice, France

¹²CIRI, Université de Lyon, INSERM U1111, ENS de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5308, 69007 Lyon, France

¹³Département de Pathologie, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Créteil, France

¹⁴IUCT, 31037 Toulouse, France

¹⁵Senior author

¹⁶These authors contributed equally

¹⁷Lead Contact

*Correspondence: els.verhoeyen@unice.fr (E.V.), ricci@unice.fr (J.-E.R.)

<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.008>

SUMMARY

GAPDH is emerging as a key player in T cell development and function. To investigate the role of GAPDH in T cells, we generated a transgenic mouse model overexpressing GAPDH in the T cell lineage. Aged mice developed a peripheral Tfh-like lymphoma that recapitulated key molecular, pathological, and immunophenotypic features of human angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL). GAPDH induced non-canonical NF- κ B pathway activation in mouse T cells, which was strongly activated in human AITL. We developed a NIK inhibitor to reveal that targeting the NF- κ B pathway prolonged AITL-bearing mouse survival alone and in combination with anti-PD-1. These findings suggest the therapeutic potential of targeting NF- κ B signaling in AITL and provide a model for future AITL therapeutic investigations.

Significance

Availability of preclinical mouse models for rare cancers is a prerequisite for revealing important pathways and targets to identify and evaluate possible treatment regimens for these patients lacking treatment options. Our GAPDH transgenic mouse model developed a Tfh-like lymphoma with a strong germinal center B cell component, mimicking angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL), a rare aggressive lymphoma. Our data confirmed that GAPDH-induced AITL disease depends mechanistically on activation of the non-canonical NF- κ B pathway, which we also confirmed to be activated in human AITL. Targeting this pathway with an NF- κ B pathway-inhibiting drug was an effective treatment for murine as well as human AITL cells. This mouse model allows testing of therapeutic options for AITL including immunotherapy.



INTRODUCTION

Immunometabolism has recently become an intense field of research. It shapes the functions and the differentiation of immune cells and reveals anti-cancer immunotherapies (Pearce and Pearce, 2018). Fundamental changes from mitochondrial to glycolytic metabolism are implemented by immune cells as well as cancer cells to meet their high energy requirement (Warburg effect) (Galluzzi et al., 2013; Kroemer and Pouyssegur, 2008). However, the role of specific metabolic enzymes in T cells and cancer is just starting to be unraveled. Aerobic glycolysis converts glucose to pyruvate through a series of ten enzymes, of which one is of particular interest: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Recent studies have demonstrated that GAPDH could have a rate-limiting function in the context of Warburg effects (Liberti et al., 2017). In addition to its role in glycolysis, GAPDH is a multifunctional protein with numerous non-glycolytic functions (Colell et al., 2007, 2009; Jacquelin et al., 2013; Lavallard et al., 2009). GAPDH is overexpressed in many cancers (Chiche et al., 2015; Liberti et al., 2017; Revillion et al., 2000), but its role in tumorigenesis is still unclear (Revillion et al., 2000). Moreover, we previously revealed GAPDH overexpression in chronic myeloid leukemia (CML) cells, which participated in CML resistance to chemotherapeutic treatment (Lavallard et al., 2009). Of note, overexpression of GAPDH, but not other glycolytic enzymes tested, protected cells from caspase-independent cell death (CICD) through persistence of a few intact mitochondria that might facilitate tumor cell survival and chemotherapy resistance (Colell et al., 2007).

At present, very little is known about GAPDH expression levels and its role in T cell differentiation and T cell cancers such as peripheral T cell lymphomas (PTCLs), but GAPDH has recently emerged as a key factor in T cell survival, activation, and function (Balmer et al., 2016; Chang et al., 2013; Xu et al., 2016). For example, GAPDH expression was implicated in T cell responses under hypoxia (Dimeloe et al., 2016; Xu et al., 2016). Acetylation of GAPDH enhances its activity, boosting rapid memory CD8⁺ T cell responses (Balmer et al., 2016). Interestingly, GAPDH can also modulate T cell effector function (Chang et al., 2013). We and others established a clear connection between high GAPDH expression and the activation of the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway (Chiche et al., 2015; Gao et al., 2013). We recently showed that elevated GAPDH expression was found to promote NF- κ B activation in a non-Hodgkin's B cell lymphoma by binding to tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2), which enhanced the transcription and the activity of hypoxia-inducible factor 1 α (Chiche et al., 2015). NF- κ B activation occurs via two major signaling pathways. The canonical pathway mediates the activation of NF- κ B1 p50, RelA, and c-Rel, whereas the non-canonical NF- κ B pathway selectively activates p100-sequestered NF- κ B members, predominantly NF- κ B p52 and RelB. The canonical NF- κ B pathway responds to engagement of immune receptors and results in rapid but transient NF- κ B activation (Sun, 2017). In contrast, activation of the non-canonical pathway is characteristically slow and persistent, and ligands of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily are inducers of the non-canonical pathway. Both NF- κ B pathways are involved in malignancy and inflammatory diseases (Cildir et al., 2016; Hoesel and Schmid, 2013;

Sun, 2017). Importantly, NF- κ B activation is associated with many T cell cancers (Balmer et al., 2016; Cildir et al., 2016; Gerdakis et al., 2014; Imbert and Peyron, 2017; Sun, 2017) and plays an essential role in T cell development and function (Gerdakis et al., 2014; Grinberg-Bleyer et al., 2017; Long et al., 2009). It is, for example, implicated in differentiation and function of regulatory T cells (Grinberg-Bleyer et al., 2017; Long et al., 2009; Vasanthakumar et al., 2017) (Jimi et al., 2008). However, the contribution of GAPDH to T cell function, differentiation, and, possibly, malignancy remains to be comprehensively elucidated.

RESULTS

Overexpression of GAPDH Exclusively in the T Cell Lineage Does Not Affect Early T Cell Differentiation

To uncover GAPDH function in T cells, we generated a transgenic mouse model in which GAPDH was overexpressed under the control of the T cell-specific promoter, plck. A V5 tag was fused to GAPDH to distinguish it from the endogenous GAPDH enzyme, and three founder animals (F16, F07, and F35) were identified (Figure 1A). Overexpression of GAPDH was validated in the plck-GAPDH transgenic mice by western blot (Figure 1B). We confirmed exclusive and strong expression in the T cell lineage (Figure 1C). GAPDH-V5 was significantly overexpressed in different thymic subpopulations of the founder plck-GAPDH mice at 4 weeks of age compared with wild type (WT) (Figure 1D). Higher overall GAPDH expression was detected in F07 and F35 thymocytes than in F16 thymocytes (Figure 1E). Notably, although GAPDH was described to inhibit a non-apoptotic cell death named CICD (Colell et al., 2007), which might play a role in thymocyte development and selection, no significant differences in thymic subpopulations were revealed in 4-week-old mice (Figure 1F).

Aged plck-GAPDH Mice Develop a Peripheral T Cell Lymphoma-like Pathology

Upon aging, the plck-GAPDH mice developed tumors (Figure 2A). Tumor frequency coincided with the GAPDH overexpression levels (Figures 1D and 2A), as the high GAPDH-expressing F07 and F35 mice all developed tumors, while tumor frequency for F16 was much lower and with delayed onset of disease (Figure 2A and data not shown). Therefore, we focused our study on F07 and F35. These plck-GAPDH mice showed onset of disease at 18 months or older (Figure 2B). Aged plck-GAPDH mice developed a pathology characterized by a generalized lymphadenopathy (Figure 2C). These mice generally developed splenomegaly, and frequently developed hepatomegaly and enlarged mesenchymal lymph nodes (MES LNs) and LNs at ectopic sites such as around the kidney, heart, or intestines (Figures 2D–2G). The spleens and LNs showed a greatly altered architecture, and the follicular structures visible in the WT were destroyed in the plck-GAPDH mice, marked by large polymorphic infiltration of T cells and B cells (Figures 2H and S1A). These pathological features pointed toward a PTCL. Remarkably, aged plck-GAPDH mice also developed a typical rash and showed a strong LN vascularization with detection of 35-fold increased expression level of vascular endothelial growth factor in murine PTCL (mPTCL) LN versus WT and the presence of venules (CD31⁺) in the LN (Figures S1B–S1D). Moreover, 50% of

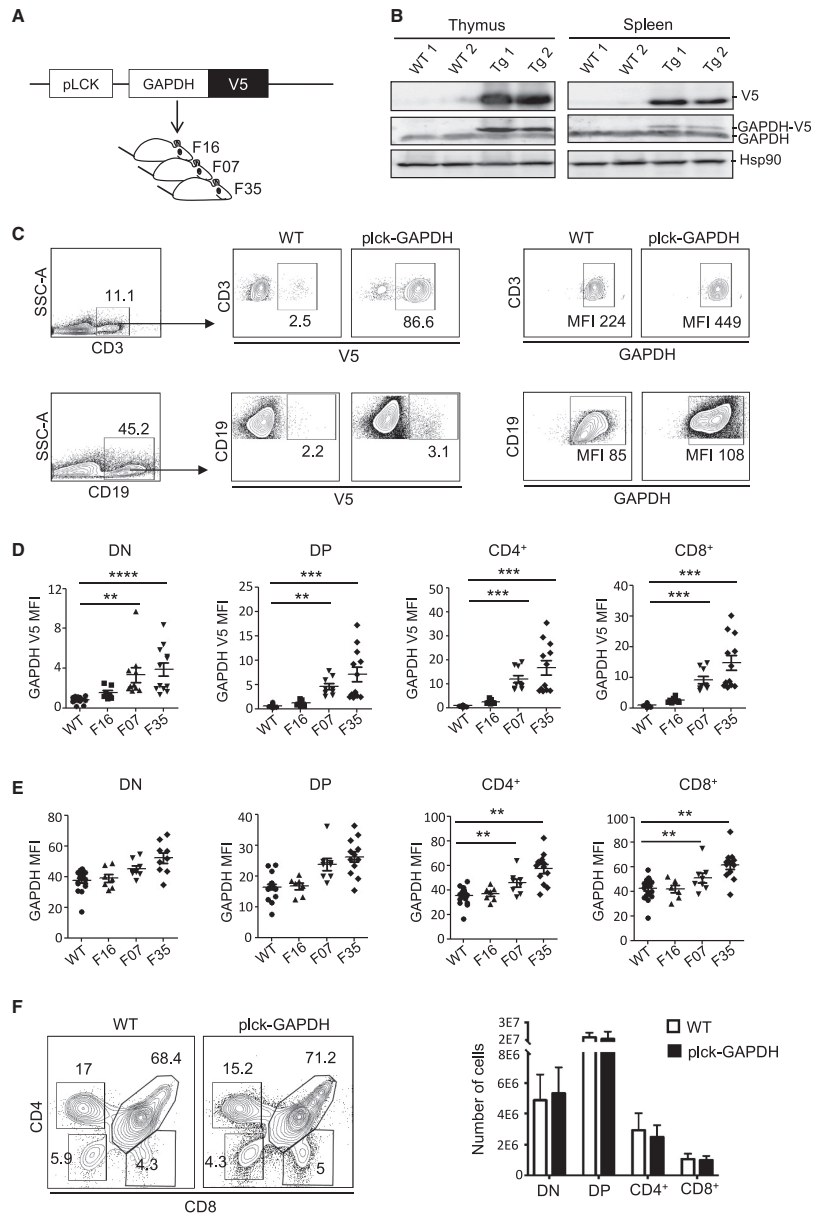


Figure 1. Overexpression of GAPDH in the T Cell Lineage Does Not Affect Early T Cell Development

(A) Schematic presentation of the GAPDH expression construct to generate three founder mice (F16, F35, F07). Plck, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase promoter; V5, tag for fluorescence-activated cell sorting (FACS) and western blot detection.

(legend continued on next page)

plck-GAPDH mice developed ascites in the abdominal region (data not shown). Finally, the splenic tumors of the transgenic mice were characterized by no changes in CD19⁺ B cell counts but a 2-fold higher cellularity of T cells and an increased ratio of CD4⁺-to-CD8⁺ T cells (Figures 2I and 2J). The combination of all these histopathological symptoms suggests that the plck-GAPDH mice developed a PTCL.

Plck-GAPDH Mice Develop a T Cell Lymphoma with a T Follicular Helper Dominance

Since tumors in plck-GAPDH mice manifested a higher presence of CD4⁺ over CD8⁺ T cells, we characterized the CD4⁺ T cells. They were positive for programmed cell death 1 (PD-1) and to a lesser extent for the chemokine receptor, CXCR5 (Figure 3A). The percentage of CD4⁺PD-1^{high}CXCR5⁺ T follicular helper (Tfh)-like cells was significantly higher in plck-GAPDH than in WT spleens, and the increase in total CD4⁺PD-1^{high} was even more pronounced (80%; Figure 3B).

Additionally, two Tfh markers, ICOS (Hu et al., 2011) and Bcl-6, were upregulated on the tumor CD4⁺ T cells (Figure 3A). They also had an activated memory phenotype (Figure 3C) and showed increased expression of the death receptor FAS (CD95) but only slight augmentation of FAS ligand (FASL, CD178) compared with CD4⁺ WT T cells (Figure 3D), both characteristics of Tfh cells. Ki67 staining indicated that these CD4⁺ T splenocytes were strongly cycling in contrast to WT splenocytes (Figure 3E), indicating the aggressiveness of these malignant T cells. When we activated CD4⁺ plck-GAPDH tumor cells by phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)/ionomycin, strong expression of the inflammatory cytokines (TNF α and interferon- γ [IFN γ]) and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) was revealed (Figure 3F). IL-10 is known to promote B cell expansion. In contrast, IL-4 (T helper cell [Th2] marker) and IL-17 (Th17 marker) expression was not increased (data not shown). Finally, we clearly detected a T cell receptor β (TCR β) and TCR γ receptor oligoclonality in the CD4⁺ T cells from different plck-GAPDH tumor-bearing mice (Figures 3G and 3H).

The above results together indicate that the plck-GAPDH mice developed a PTCL with a pronounced Tfh-like phenotype.

Plck-GAPDH Tfh-like Lymphoma Is Associated with Germinal Center and Plasma B Cells

Tfh reside in germinal centers (GCs) and normally interact with GC B cells, ultimately yielding plasma cells (PCs) and memory B cells (Cildir et al., 2016). Indeed, B cell phenotyping of cells in the enlarged spleens and LNs of the plck-GAPDH mice demonstrated significantly increased percentages of CD95⁺GL-7⁺ GC B cells compared with WT (Figures 4A and 4B). Additionally, plck-GADPH

B cells demonstrated increased levels of FAS and FASL compared with WT (Figure 4C), underlining the importance of Tfh FAS and GC B FASL interaction for cell survival. PD-1 expression on Tfh not only regulates GC survival but also affects PC differentiation (Hu et al., 2011; Xu et al., 2014). Identification of PCs by CD138⁺CD19⁻B220^{low} surface expression showed that 60% of the plck-GAPDH tumor mice showed more PCs than WT mice (PC WT < 5%), varying from 6% to 80% of total mononuclear cells (Figures 4D and 4E).

Co-residence of Tfh, GC, and plasma B cells in the plck-GAPDH tumors stresses that this mouse model closely mimics a human Tfh PTCL cancer (Ahsanuddin et al., 2011; Nagoshi et al., 2013). We also detected cycling B cells, hypergammaglobulinemia, and presence of autoantibodies in the sera of mPTCL-bearing plck-GAPDH (Figures S2A–S2C). This notion of a PTCL is further reinforced by increased numbers of tumor-associated myeloid cells, specifically follicular dendritic cells (FDCs) (CD35⁺) and total DCs (CD11c⁺), in the enlarged plck-GAPDH LNs compared with WT mice (Figures S1C and S2D). Of note, strong infiltration of the CD4⁺PD-1⁺ Tfh cells and GC B cells in the bone marrow was confirmed in all tumor-bearing plck-GAPDH mice (Figure S2E).

To confirm that the plck-GAPDH mouse developed a rare T cell lymphoma, we transferred the tumor cells from enlarged LN or spleens into NOD/SCID γ c^{-/-} (NSG) recipient mice (Traggiai et al., 2004). Engrafted NSG mice recapitulated the disease characteristics of the plck-GAPDH donor mice (Figure S2F). Tumors showed a strong increase of CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio (Figure S2G), high expression of PD-1 on CD4⁺ T cells, and the co-residence of GC B cells in the tumors (Figure 4F). We confirmed Tfh and GC B cell colonization of the spleen in three independent NSG recipients per donor (Figure 4G). We also detected infiltration of Tfh and GC B cells in the bone marrow of recipient NSG mice (Figure S2H) and confirmed that engrafted T cells conserved oligoclonality for the TCR β chain (Figure S2I).

Co-residence of Tfh, GC, and plasma B cells and tumor-associated cells in the plck-GAPDH tumors stresses that this mouse model strongly mimics a human Tfh PTCL.

Plck-GAPDH PTCLs Have a Gene-Expression Profile Resembling that of AITL Patient PTCL

To identify the human PTCL (hPTCL) counterpart of the PTCL developed by plck-GAPDH mice, we compared the gene-expression profile (GEP) of our mPTCL with those of hPTCLs. The mPTCLs contained on average 30.0% \pm 6.2% CD4⁺ cells. Initially, we compared GEPs of murine splenic PTCLs and normal WT splenocytes, identifying 471 up- and 847 downregulated genes. Gene set enrichment analysis (GSEA) for a Tfh-upregulated

(B) Western blot using an anti-V5 antibody for GAPDH-V5 detection and anti-GAPDH for detection of endogenous GAPDH and GAPDH-V5 in plck-GAPDH transgenic (Tg 1 and Tg 2) or wild-type (WT 1 and WT 2) 5-week-old mice.

(C) Intracellular GAPDH-V5 and GAPDH detection in T cells (CD3⁺) and B cells (CD19⁺) from the spleen analyzed by FACS in 5-week-old mice.

(D) Ectopic GAPDH-V5 expression levels (mean fluorescence intensity [MFI]) detected by FACS using anti-V5 antibody in thymocyte subpopulations: double-negative, DN (CD4⁻CD8⁻); double-positive, DP (CD4⁺CD8⁺); CD4⁺ (CD8⁻CD4⁺) and CD8⁺ (CD4⁻CD8⁺) cells from WT (n = 18) and three founder plck-GAPDH mice at 5 weeks (F07, n = 7; F16, n = 15, and F35, n = 13; mean \pm SD, p < 0.001, one-way ANOVA for all groups).

(E) Total GAPDH expression levels (MFI) detected by FACS using anti-GAPDH antibody in the DN, DP, CD4⁺, and CD8⁺ thymocytes for WT (n = 18) and three founder plck-GAPDH mice (F07, n = 7; F16, n = 15, and F35, n = 13; mean \pm SD, $**p$ < 0.0, one-way ANOVA) at 5 weeks of age.

(F) Distribution of DN, DP, CD4⁺, and CD8⁺ thymocytes analyzed by FACS in WT and plck-GAPDH mice, and thymocyte cell numbers, are summarized in a histogram (mean \pm SD, n = 5).

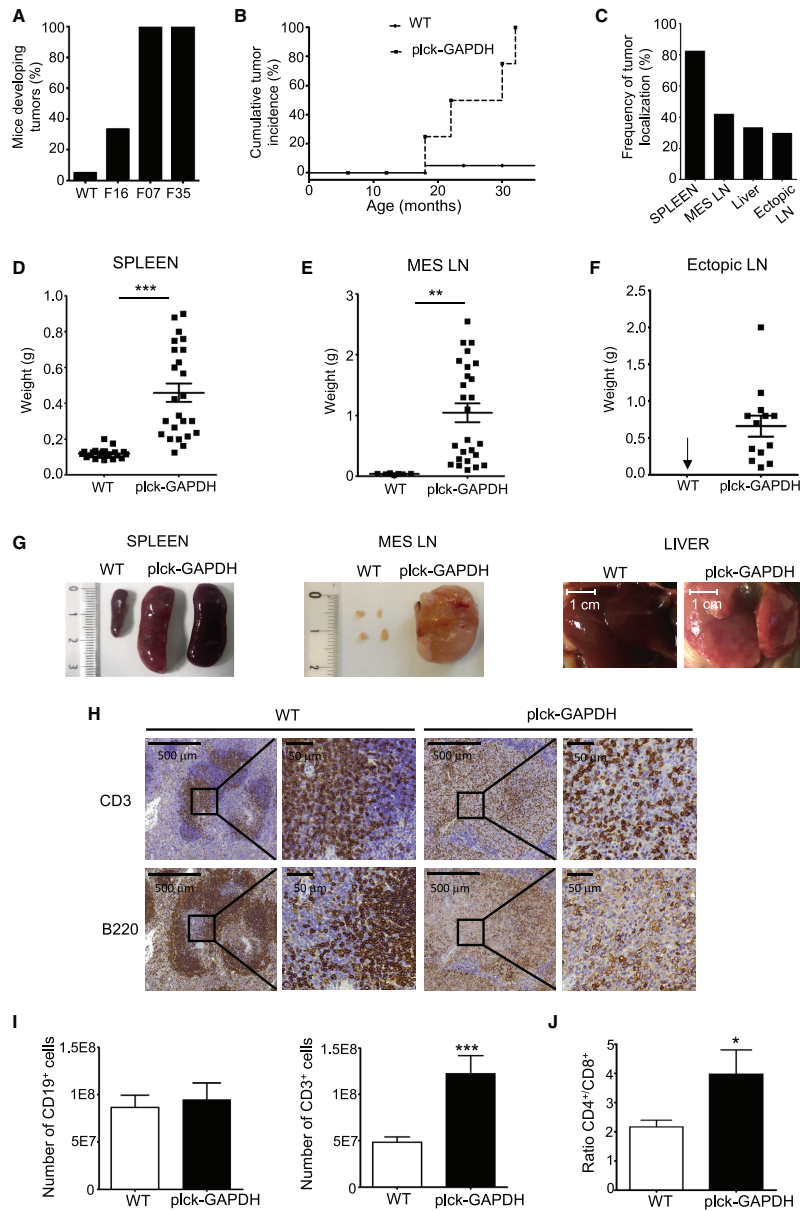


Figure 2. Aged plck-GAPDH Mice Develop a PTCL-like Lymphoma

(A) Frequency of tumor appearance among the different plck-GAPDH founder mice (20/20 for F07; 20/20 for F35; 6/16 for F16; 2/23 for WT).

(B) Cumulative incidence of tumor development in plck-GAPDH mice from the founders F07 and F35 according to their age (plck-GAPDH, n = 40; WT, n = 30).

(legend continued on next page)

gene set (18 genes), based on previous studies (de Leval et al., 2007; Jain et al., 2015), showed upregulation of Tfh signature genes and signature enrichment in the murine lymphomas compared with WT (Figures 5A and 5B). This was already suggested by their immunophenotype (CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1^{high}, Figures 3A–3E). To further validate the Tfh characteristics, we confirmed the upregulated expression of CXCL13, IL-21, and Bcl-6, all Tfh regulators, in mPTCL isolated CD4⁺ T cells compared with WT CD4⁺ splenocytes (Figure 5C). In contrast, BLIMP, an antagonist regulator of Tfh cell differentiation, was not upregulated (Johnston et al., 2009).

Additionally, GSEA for a GC-plasma B cell signature (24 genes) (Recaldin and Fear, 2016) showed an upregulation of GC- and PC-enriched gene expression in mPTCLs (Figures 5D and 5E), indicating a mixed GC and PC B cell signature.

One of most prominent hPTCL with Tfh dominance associated with GC/plasma B cells is angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL), a rare devastating cancer (Federico et al., 2013). The described pathological and immunophenotypic characteristics of the plck-GAPDH mPTCL closely match human AITL (hAITL) (Table S1). Indeed, when we compared the GEP data of LNs from 60 AITL patients with healthy LNs, we found increased expression of CXCR5, PD-1, CXCL13, Bcl-6, ICOS, and IL-21, confirming the Tfh neoplastic expression pattern in the analyzed AITL patient cohorts (de Leval et al., 2007; Iqbal et al., 2014; Roth et al., 2006), similar to the plck-GAPDH mPTCLs (Figure S3A). The GC and PC B cell signature in the AITL patients (Figure S3B) also matched the plck-GAPDH mPTCL. Finally, an even more specific AITL gene signature was confirmed in the mPTCLs (Figures S3C and S3D).

To further validate the AITL pathology, we decided to compare the cytokine and chemokine mRNA expression profiles of plck-GAPDH mouse LNs (Figure S3E) with AITL patient LNs. AITL is characterized by strong autoimmune inflammatory signals (de Leval et al., 2007) such as increased IFN γ , IL-1 receptor α (IL1R α), IL-6, and TNF α (Figure S3F). We confirmed the mRNA expression data in Figure S3E by quantification of secreted cytokines and chemokines in PMA/ionomycin-stimulated plck-GAPDH mPTCL cells (Figure S3G). Increased levels of inflammatory (IFN γ , IL1R α , IL-6, and TNF α) and anti-inflammatory (IL-10 and IL-6) cytokines were comparable with an AITL gene-enriched inflammation signature (Figures S3F and S3G). In AITL, Tfh and GC B cell and microenvironment interaction is based on cytokine-chemokine crosstalks (Mourad et al., 2008). GEP of mPTCL versus WT splenocytes revealed an upregulated expression of multiple cytokines but also of chemokines corresponding to those of AITL patient LNs (Figures S3H–S3K). Moreover, our mPTCL clearly showed a prominent upregulation of humoral immune response genes (Table S2) confirming the presence of PCs in our tumors, and vascularization in the LNs was

confirmed by upregulation of vascularization-related genes (Table S2). All these data confirmed again the matching characteristic features between mPTCL and AITL (de Leval et al., 2007, 2010). Interestingly, 1-year old premalignant plck-GAPDH mice showed no prominent skewing in the T and B cell populations (Figures S4A–S4D) except for the fact that a population of Tfh-like CD4⁺PD-1^{high} T cells and GC B cells were starting to emerge (Figures S4E and S4F). However, no increased cytokine secretion, TCR signaling, T cell activation, nor increased proliferation were detected in plck-GAPDH versus WT CD4⁺ T cells from 1-year-old mice (Figures S4G–S4J).

We confirmed that the glycolytic enzyme GAPDH was still strongly overexpressed in the mPTCLs at the mRNA and protein level compared with age-matched WT animals (Figure 5F). Strikingly, GAPDH expression was higher in AITL patient LNs than in healthy LNs (Figure 5G). Metabolic pathway analysis did not show pronounced upregulation of glycolysis in the plck-GAPDH lymphoma (Figure 5H). In contrast, CD4⁺ splenocytes from premalignant 1-year-old plck-GAPDH mice showed upregulated glycolysis compared with WT, especially when activated through the TCR as detected by increased extracellular acidification rate, glucose uptake, and lactate production (Figures S4K–S4M). In plck-GAPDH mPTCL, we detected increased mitochondrial respiration (Figure 5H), which was already observed in CD4⁺ T cells from 1-year-old plck-GAPDH upon TCR engagement (Figure S4N).

AITL frequently carries a G17V (p.Gly17Val) mutation in *RHOA* (Palomero et al., 2014; Sakata-Yanagimoto et al., 2014), which encodes the small guanosine triphosphatase (GTPase) *RHOA*. In plck-GAPDH CD4⁺ T cells isolated from tumors, we found two mutations in the effector domain of *RHOA*, one point mutation at position 37 (T37M) present in all 15 plck-GAPDH tumors and an INDEL frameshift mutation consisting of a 5-bp insertion into codon 44 present in 4 of 15 plck-GAPDH tumors (Figure 6A). Sanger and whole-exome sequencing of the WT C57BL6J/OlaHsd strain used to generate the plck-GAPDH mice indicated that the T37M mutation and INDEL were not present in the germline (Figures S5A and S5B). The point mutation T37M reduced *RHOA* activity as measured by the reduced affinity for GST-rhotekin-RBD compared with the WT or the Q63L active mutant of *RHOA* (Figure 6B), identifying T37M as an inactivating mutation in *RhoA*. Additionally, the effect of the T37M mutation on *RHOA* was equivalent to the T37A mutation found in follicular lymphoma and gastric cancer (Figures 6B and 6C), and the activity of *RHOA* T37M was even lower than that for a well-established mutation (T19N) in the guanosine triphosphate/guanosine diphosphate binding domain (Figure 6B). The INDEL frameshift mutation in *RHOA* is a truncating mutation, which would likely result in a truncated protein (Figure S5C).

(C) Frequency of tumor localization in plck-GAPDH mice. Ectopic LN were localized at kidney, thymus, and intestines.

(D–F) Weight of spleens (D), mesenchymal LNs (MES LN) (E), and ectopic LNs (F) of WT mice and plck-GAPDH mice presenting tumors (means \pm SD, n = 24; ***p < 0.001; **p < 0.01, Student's t test).

(G) Representative pictures of spleen, MES LN, and liver of WT and plck-GAPDH mice presenting tumors.

(H) Hematoxylin and eosin staining patterns and immunohistochemistry staining for CD3⁺ T cells and B220⁺ B cells of WT and plck-GAPDH spleens.

(I and J) Numbers of B (CD19⁺) and T (CD3⁺) cells (I) and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells (J) in the spleens of WT and plck-GAPDH tumor-bearing mice (means \pm SD, n = 6; ***p < 0.001, **p < 0.05, Student's t test).

See also Figure S1.

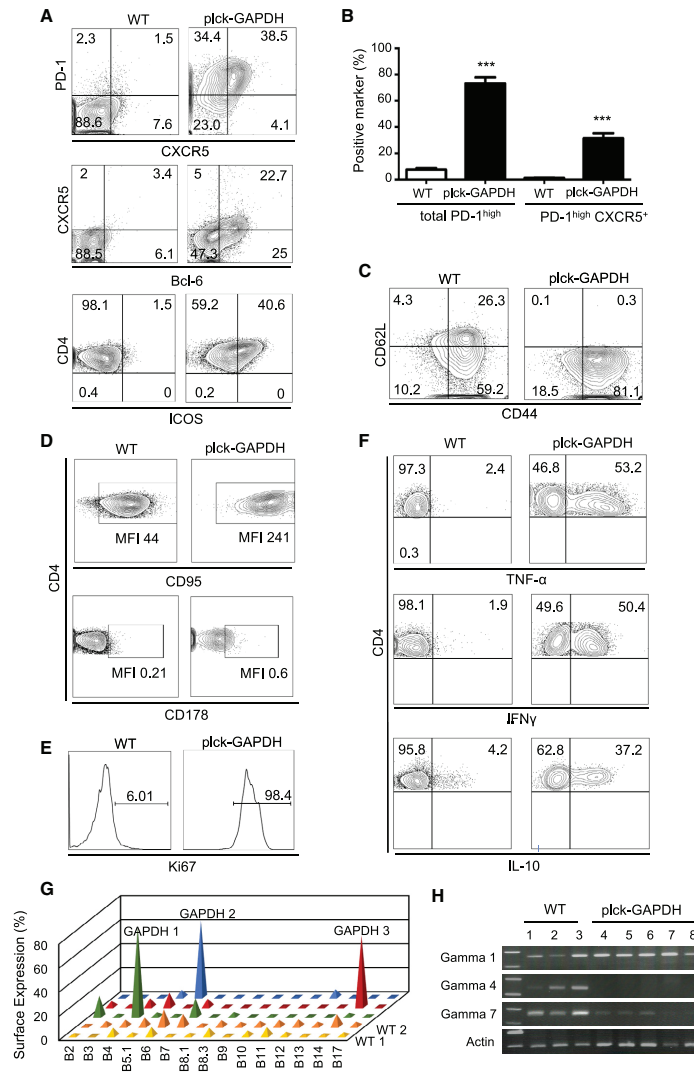


Figure 3. plck-GAPDH Mice Developed a T Cell Lymphoma with a Pronounced Tfh Phenotype
 (A) Comparison of Tfh cell (CD4⁺CXCR5⁺ PD-1^{high}, CD4⁺CXCR5⁺Bcl-6⁺, and CD4⁺ICOS⁺) infiltration in the spleen of plck-GAPDH and WT mice analyzed by FACS. Representative of n = 10. Initial gating on CD4⁺ cells is performed.
 (B) Percentages of CD4⁺ T cells that are PD-1^{high} CXCR5⁺ PD-1^{high} T cells in WT and plck-GAPDH spleens (means ± SD, n = 10; ***p < 0.001, Student's t test).
 (C) CD4⁺ T cell staining for CD62L and CD44 in plck-GAPDH tumors and WT spleens by FACS. Representative of n = 6.
 (D) Expression of FAS receptor (CD95) and FAS ligand (CD178) on CD4⁺ T cells by FACS. Representative of n = 6.
 (E) Intracellular staining of Ki67 in CD4⁺ splenocytes by FACS. Representative of n = 3.
 (F) Intracellular marking of IFN γ , IL-10, and TNF α in CD4⁺ splenocytes upon PMA/ionomycin stimulation in WT and plck-GAPDH mice. Representative of n = 4.
 (G) Expression of the different TCR- β chains on WT (WT 1, WT 2) and plck-GAPDH (GAPDH 1, 2, 3) CD4⁺ T cells analyzed by FACS.
 (H) Detection of different TCR- γ chains by PCR in CD4⁺ splenic cells isolated from WT (lanes 1–3) or plck-GAPDH lymphoma-bearing mice (lanes 4–8).

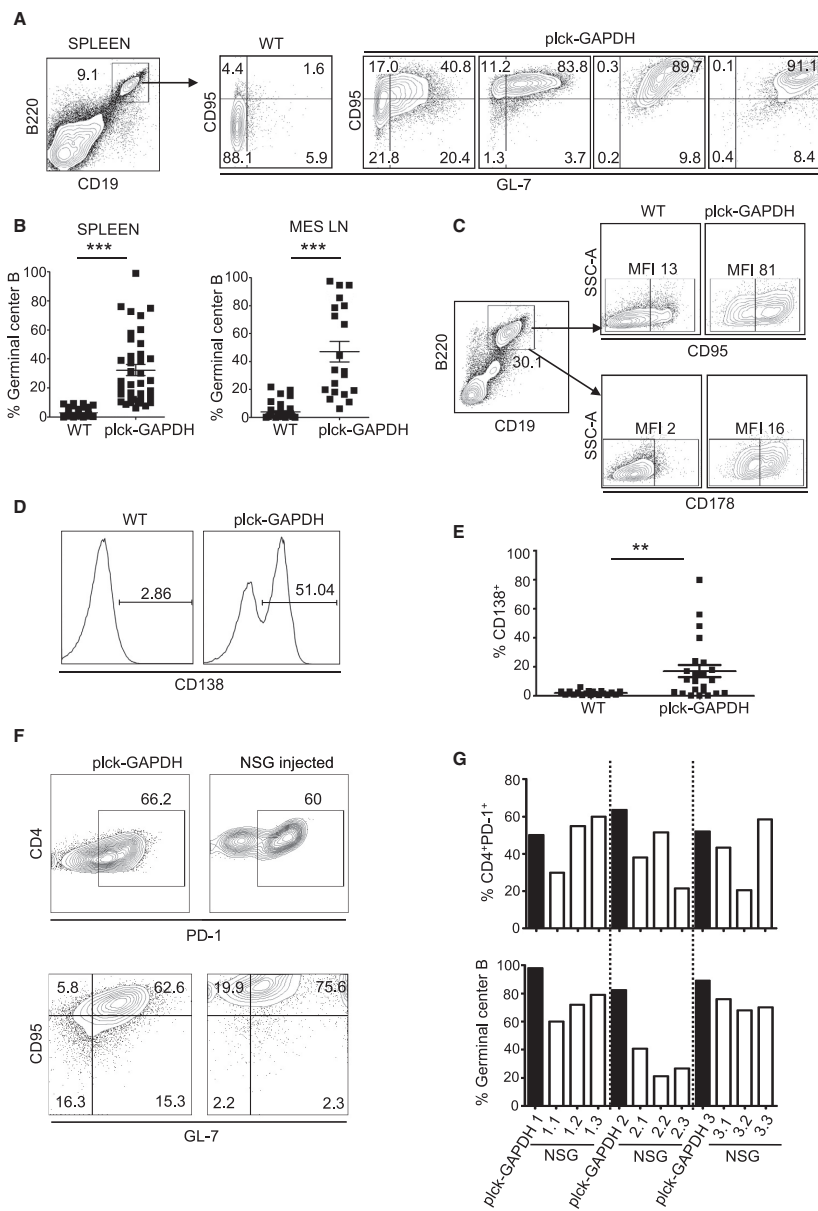


Figure 4. Germinal Center B Cells Are Strongly Increased in plck-GAPDH Tumors

(A) GC B cells identified by FACS using staining for FAS (CD95) and GL-7 gated on CD19⁺B220⁺ B cells. Representative of n = 10.

(B) Percentage of GC B cells on CD19⁺B220⁺ cells in WT and plck-GAPDH spleens and MES LN (mean ± SD; spleen, n = 38; LN, n = 20; ***p < 0.001, Student's t test).

(legend continued on next page)

Whole-exome sequencing revealed additional mutations in the plck-GAPDH lymphoma CD4⁺ cells (Tables S3–S6). Of note, however, many of the identified mutations in epigenetic modifiers and TCR signaling genes that were also mutated in hAITL were intronic or intergenic in our mPTCL and likely would not lead to loss of function (Tables S3 and S4).

The above data support our suggestion that mPTCL resembles in great detail hAITL, indicating that the plck-GAPDH mouse model represents a valid model for this lymphoma.

Plck-GAPDH Develop an AITL-like PTCL via a GAPDH-Dependent Activation of the NF- κ B Pathway

Constitutive activation of NF- κ B signaling has been observed in various tumors including lymphomas and leukemia (Imbert and Peyron, 2017), and we have shown that GAPDH enhances B cell lymphoma aggressiveness via activation of NF- κ B (Chiche et al., 2015). Moreover, our GEP data showed that many NF- κ B targets are upregulated in our plck-GAPDH tumors such as IFN γ , ICOS, IL-6, CCL5, CCL2, CCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, immunoglobulin G heavy chains, CD40, CD44, ICAM-1, and IRF4. We confirmed an upregulation of the NF- κ B canonical pathway target genes in thymocytes from 4-week-old plck-GAPDH mice (Figure S6A). Activation of the canonical pathway was established by phosphorylation of p65 (Figure S6B) and the binding of TRAF2 to GAPDH (Figure S6C).

GSEA for an NF- κ B gene signature (Gerondakis et al., 2014) showed upregulation of the NF- κ B canonical and non-canonical pathway as well as of their target genes in the plck-GAPDH mPTCL compared with WT splenocytes (Figures 7A and 7B), which was confirmed by qPCR analysis of isolated CD4⁺ cells from mPTCL (Figures 7C and 7D). Activation of the non-canonical pathway was confirmed by increased phosphorylation of p100 and its cleavage into p52 in CD4⁺ mPTCL cells as compared with WT splenocytes (Figure S6D).

We also detected in hAITL a slight upregulation of the canonical NF- κ B pathway (Figure 7E) and a strong activation of the non-canonical NF- κ B pathway (Figure 7F) characterized by increased RelB expression and strong upregulation of the non-canonical target genes EZH2 and IRF4, while other non-canonical targets, SP-1 and ENPP2, were not or slightly upregulated, equivalent to the mPTCL (Figures 7E and 7F).

Finally, to establish whether the modulation of NF- κ B pathway is a central event in mPTCL induction, we aged plck-p65^{-/-} mice, unable to activate the canonical NF- κ B pathway in T cells, and plck-I κ B^{-/-} mice, characterized by a constitutive activation of the NF- κ B pathway in the T cell compartment. At 18 months, the plck-I κ B^{-/-} mice developed a Tfh T cell lymphoma with CXCR5⁺PD-1⁺CD4⁺ T cells and CD95⁺GL-7⁺ GC B cells, an increased CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio, and higher GAPDH, IL-21, CXCL13, and Bcl-6 expression levels (Figures 7G and 7H).

Upregulation of the non-canonical NF- κ B pathway was also detected in CD4⁺ cells from the plck-I κ B^{-/-} mPTCL (Figure S6E). All these features are identical to mPTCL developed by plck-GAPDH mice. Additionally, CD4⁺ splenocytes from 1-year-old premalignant plck-GAPDH mice had upregulated the canonical NF- κ B pathway and initiated the upregulation of the non-canonical pathway (Figure S6F). To further confirm the role of GAPDH in NF- κ B activation, we generated plck-GAPDH/p65^{-/-}, in which the canonical NF- κ B pathway is inactivated. Since the development of plck-GAPDH tumors can take over 2 years, we isolated splenic CD4⁺ cells from age-matched WT, plck-GAPDH, plck-p65^{-/-}, and plck-GAPDH/p65^{-/-} mice and cultured them under Tfh-inducing conditions. Only the plck-GAPDH-derived CD4⁺ cells expressed Tfh markers at 3 weeks of culture (Figure S6G), accompanied by upregulation of the canonical and non-canonical NF- κ B pathway (Figure S6H), while plck-GAPDH/p65^{-/-} CD4⁺ T cells were equivalent to WT. This underlined the importance of induction of the NF- κ B pathway by GAPDH in accelerated Tfh development.

Finally, we evaluated whether GAPDH is still required for mPTCL growth once established. Ten NSG mice were engrafted with plck-GAPDH lymphoma and were treated upon tumor establishment with a GAPDH-specific inhibitor, koningic acid (KA), or vehicle (Figure S6I). No difference in survival of the two groups of mice was detected (Figure S6J). Despite a reduction in GAPDH activity in the KA-treated mice (Figure S6K), both groups developed splenomegaly (Figure S6L), and the KA-treated group did not show a change in B, T, or Tfh CD4⁺PD-1^{high} cells nor in NF- κ B activity (Figures S6M–S6P). This suggests that while GAPDH can drive mPTCL development, it is not required to maintain mPTCL tumor growth once it is established.

This indicates that GAPDH-induced constitutive activation of the NF- κ B pathway in T cells results in a dominant Tfh PTCL equivalent to AITL, underlined by a shift toward the NF- κ B non-canonical pathway in the tumor cells.

Plck-GAPDH Mice Developing AITL Respond to Non-canonical NF- κ B Inhibition and Anti-PD-1 Treatment

Activation of the non-canonical pathway depends on the activation of the NF- κ B-inducing kinase (NIK) and IKK α phosphorylation (Xiao et al., 2001). We confirmed a 9-fold and 3-fold increased NIK expression in the mPTCL CD4⁺ T cells and CD19⁺ GC B cells compared with WT counterparts, respectively (Figure 8A), suggesting that NIK could represent a therapeutic target in AITL. PD-1 and its ligand PD-L1, which play a central role in downmodulation of anti-tumor immunity (Topalian et al., 2016), might also represent AITL therapeutic targets. High PD-1 expression was characteristic for CD4⁺ Tfh cells in our plck-GAPDH AITL-like tumors (Figures 3A and 3B). Therefore,

(C) Representative FACS plot showing the expression levels (MFI) of FAS (CD95⁺) and FAS ligand (CD178⁺) in WT versus plck-GAPDH B cells (CD19⁺B220⁺). Representative of n = 5.

(D) FACS histogram showing the quantity of plasmacytes (CD19-B220 low, CD138⁺) per total nucleated cells in the spleen.

(E) Summary of the percentage of plasma B cells from (D) (mean \pm SD, n = 22; **p < 0.01, Student's t test).

(F and G) Total splenocytes from tumor-bearing plck-GAPDH mice were transferred to NSG mice, which were sacrificed 6–8 weeks post injection. PD-1⁺CD4⁺ T cells and GC B cells (CD95⁺GL-7⁺) in donor plck-GAPDH mice and in NSG mice after engraftment were analyzed by FACS (F), and the percentages of CD4⁺ T cells that were PD-1⁺ and B cells that were CD95⁺GL-7⁺ were quantified for three independent tumors (G).

See also Figure S2.

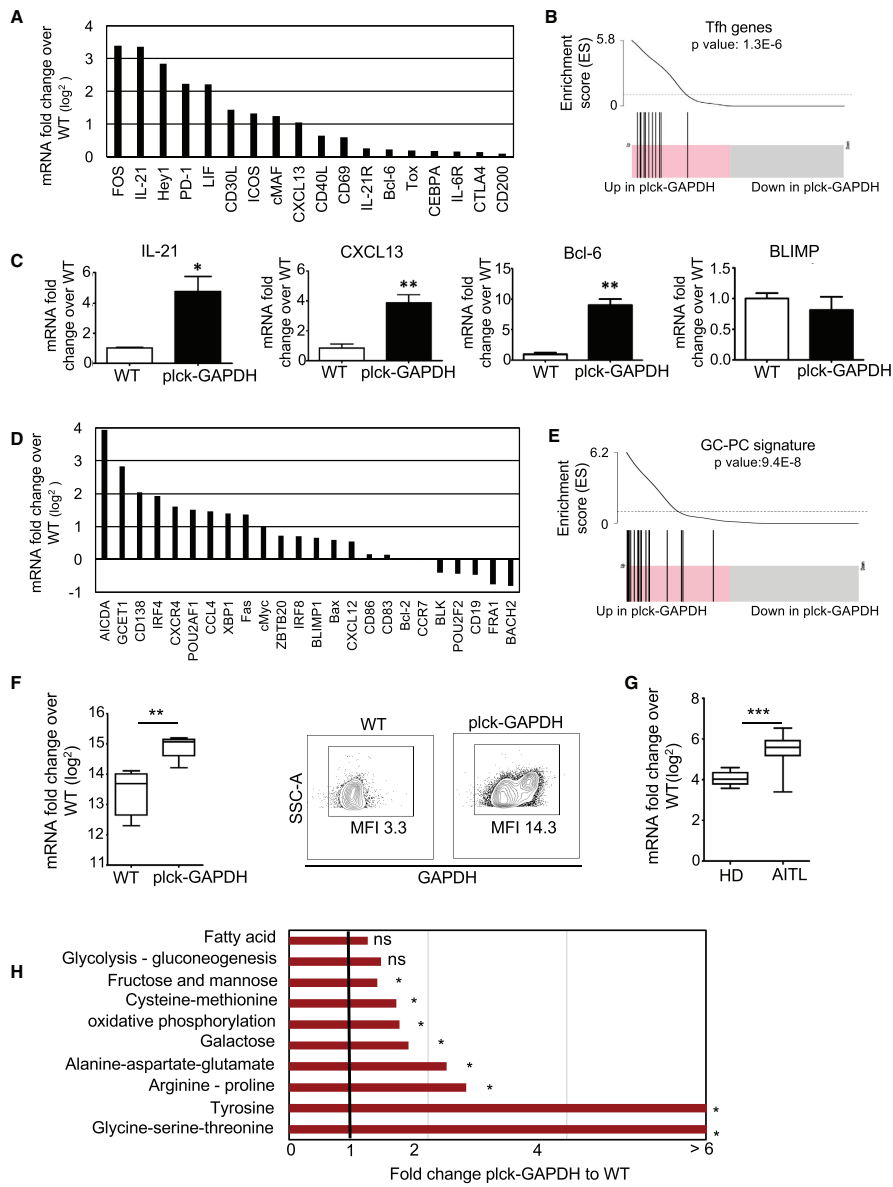


Figure 5. Plck-GAPDH mPTCL Transcriptional Profile Corresponds to that of AITL Patients

(A) mRNA expression (log₂) of Tfh signature genes based on gene-expression analysis (GEA) of RNA-sequencing (RNA-seq) data in total splenocytes of lymphoma developing plck-GAPDH relative to WT splenocytes.

(legend continued on next page)

we opted to investigate treatments with an NIK inhibitor alone or in combination with anti-PD-1 in our AITL model.

Due to a lack of specific NIK inhibitors, we developed NIK^{inh}, a substituted halo-quinoline derivative characterized by potent anti-NIK activity (patent PCT/EP2017/067306; Figure S7A). NIK^{inh} was able to inhibit NIK's ability to phosphorylate a substrate protein *in vitro* in an ATP-dependent manner (ADP-Glo assay; Figure S7A), demonstrating inhibition of NIK ATPase activity. Using a biotinylated version of the drug (NIK^{inh}-biotin) compared with biotin alone or mock conjugated biotin (phenyl-biotin and aminoquinolonyl-biotin), we confirmed that NIK^{inh}-biotin was able to affinity precipitate NIK (Figure S7B). Increasing the ratio of free NIK^{inh} and NIK^{inh}-biotin (1:1 and 10:1) reduced the amount of NIK precipitated (Figure S7B), which indicates that the observed interaction between the NIK^{inh} and NIK is specific. NIK^{inh} also reduced EZH2 expression, a downstream target of NIK, in a dose-dependent manner in a melanoma cell line characterized by upregulation of non-canonical pathway (A375), and concomitantly increased the expression of CDKN1A/p21 (Figure S7C). Additionally, we showed that this NIK^{inh} decreased cleavage of p100 into p52, and EZH2 at the protein level in A375 cells, lung cancer cells (A549), and freshly isolated patient melanoma cells (C12.06) (Figure S7D). We then compared the effects of our NIK^{inh} with those of NF- κ B2-siRNA on the proliferation of the A375, C12.06, and A549 cancer cells. The treatments had similar inhibitory effects on the proliferation of the cancer cells and no effect on normal human melanocytes or fibroblasts (Figure S7E), emphasizing that the inhibitor is specific for cancer cells that have the non-canonical NF- κ B pathway upregulated. Moreover, we have also confirmed these data in three different diffuse large B cell lymphoma cell lines (U2932, Karpas 422, and SUDHL-6; Figure S7F).

We next evaluated treatment with this NIK^{inh} alone or in combination with an anti-PD-1 *in vivo* in our AITL transplant model. Both NIK^{inh} single treatment and combined with anti-PD-1 resulted in significantly increased survival of up to 60% and 70% of the plck-GAPDH tumor-engrafted mice, respectively, compared with control-treated mice (Figure 8B). At sacrifice, we detected a significant decrease in spleen size for the single- and double-treated mice compared with controls (Figure S8A). For both treatment conditions, we confirmed a decrease in B cells in the spleen while a reduction in T cells was more prominent for the NIK^{inh} single treatment alone than in the combination treatment group (Figures 8C and 8D). CD4⁺ T cells were depleted

completely for the Tfh PD-1^{high} population in the combination treatment group, while a residual subpopulation of PD-1^{high}CD4⁺ cells was detected in mice treated with NIK^{inh} only (Figure 8E). The CD4⁺ clonality for TCR- β 7 detected in the initial tumor was not detected as dominant in the NIK^{inh} + anti-PD-1-treated mice, but TCR- β 7 dominance was still present in residual CD4⁺ cells for the single NIK^{inh} treatment (Figure S8B). Additionally, expression of non-canonical NF- κ B pathway components and targets was reduced in residual CD4⁺ T cells following combined NIK^{inh} and anti-PD-1 treatment, demonstrating the efficacy of NIK^{inh} to inhibit the non-canonical NF- κ B pathway *in vivo* (Figure S8C). In the double-treated group, anti-PD-1-mediated induction of immune response was confirmed by increased production of IFN γ , granzyme B, and perforin by cytotoxic CD8⁺ cells, while the NIK^{inh} alone was capable of increasing IFN γ release but not granzyme B and perforin (Figure 8F). Of note, PD-1 was highly expressed in CD4⁺ but not CD8⁺ T cells in the primary mPTCL, while CD4 Tfh, CD8 T cells, and GC B cells expressed PD-L1 at high levels (Figure S8D), suggesting that anti-PD-1 treatment may not only disrupt T-T cell interactions but also T-B cell interactions, known as drivers of T and B cell proliferation in PTCL. Therefore, we evaluated anti-PD-1 treatment alone. Anti-PD-1-treated plck-GAPDH mPTCL-engrafted mice had significantly increased survival compared with control-treated animals, and two mice survived long term upon continuous treatment (Figure S8E). A strong depletion of CD4⁺ T cells was detected in the spleen (Figure S8F), while CD8⁺ cells were unaffected (data not shown), resulting in a reduced CD4⁺/CD8⁺ ratio (Figure S8G). In contrast, anti-PD-1 treatment increased the percentage of B cells in the spleen but decreased the percentage of GC B cells compared with control treatment (Figures S8H and S8I). As detected for the combination treatment (NIK^{inh} + anti-PD-1), anti-PD-1 treatment stimulated an immune response, confirmed by increased production of IFN γ , granzyme B, and perforin by cytotoxic CD8⁺ T cells (Figure S8J).

To further emphasize the relevance of NIK inhibition in hAITL, we isolated CD4⁺ T cells from human AITL tumor samples. As detected in our mAITL tumors, the hAITL CD4⁺ T cells showed a Tfh phenotype (PD-1^{high}, ICOS⁺, CXCR5⁺) and B cells demonstrated a GC B cell (GL7⁺) phenotype (data not shown). Both cell types showed strong upregulation of NIK (up to 8-fold) in most cases compared with their healthy counterparts (Figures 8G and 8H). We clearly demonstrated that NIK^{inh} treatment *ex vivo* reduced the growth of CD4⁺ Tfh cells from hAITL biopsies

(B) GSEA for 18 Tfh-related genes indicated in (A). For all genes with enrichment score >0 (black bars in the pink zone), expression is upregulated. Kolmogorov-Smirnov (KS) test.

(C) mRNA expression levels by qPCR analysis of CXCL13, IL-21, Bcl-6, and BLIMP in CD4⁺ T splenocytes isolated from plck-GAPDH mPTCL and WT mice. Expression for WT was set to 1 (mean \pm SD, n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01, Student's t test).

(D) mRNA expression levels (log₂) of GC/plasma B cell signature genes based on the GEA of RNA-seq data in plck-GAPDH relative to WT splenocytes.

(E) GSEA for GC/plasma B cell related genes presented in (D). For all genes with enrichment score >0 (black bars in the pink zone) expression is upregulated. KS test.

(F) mRNA expression level (RNA-seq data) of GAPDH (log₂) in CD4⁺ T splenocytes isolated from plck-GAPDH mPTCL compared with WT splenocytes (box plots represent the 25th and 75th percentiles with midlines indicating the median values; whiskers extend to the maximum and minimum values of the data samples) (**p < 0.01, Student's t test), and GAPDH intracellular staining in CD4⁺ mPTCL and healthy splenocytes analyzed by FACS.

(G) mRNA expression levels (RNA-seq data) of GAPDH in LN from AITL and healthy donors (box plots represent the 25th and 75th percentiles with midlines indicating the median values; whiskers extend to the maximum and minimum values of the data samples; ***p < 0.001, Student's t test).

(H) Metabolic pathway analysis from RNA-seq data of the plck-GAPDH lymphoma versus WT splenocytes was performed using the KEGG database. *p < 0.05; ns, not significant.

See also Figures S3 and S4; Tables S1 and S2.

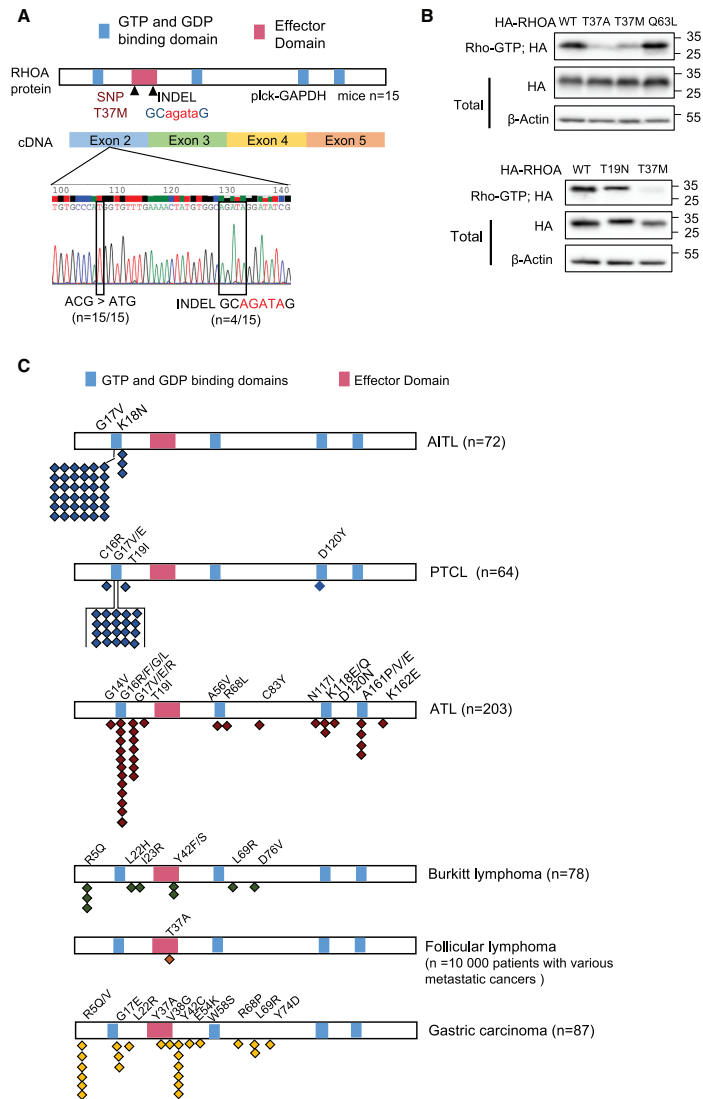


Figure 6. RHOA Mutations and Other Mutations Identified in plck-GAPDH Tfh mPTCL

(A) Sanger sequencing of isolated mPTCL lymphoma CD4⁺ cells identified a *RHOA* single bp mutation (T37M) and INDEL (frameshift insertion) mutation. The T37M mutation was detected in 15 out of 15 different plck-GAPDH mice and the INDEL in 4 out of 15 plck-GAPDH mice. (B) Active RHOA (Rho-GTP) was compared using a GST-rhotekin RBD pull-down assay using lysates of HEK293T transfected with WT and different RHOA-inactivating mutants (T37M, T37A, T19N) or an RHOA-activating mutant (Q63L). (C) *RHOA* mutations in patients according to published data for AITL (Vallois et al., 2016), PTCL (Palomero et al., 2014), adult T cell leukemia/lymphoma (ATL [Nagata et al., 2016]), follicular lymphoma (Zehir et al., 2017), Burkitt lymphoma (Rohde et al., 2014) and gastric carcinoma (Kakiuchi et al., 2014). Each symbol represents a patient for the indicated mutation and the number of symbols represent the frequency of that mutation found per total number of patients (n) analyzed. See also Figure S5 and Tables S3–S6.

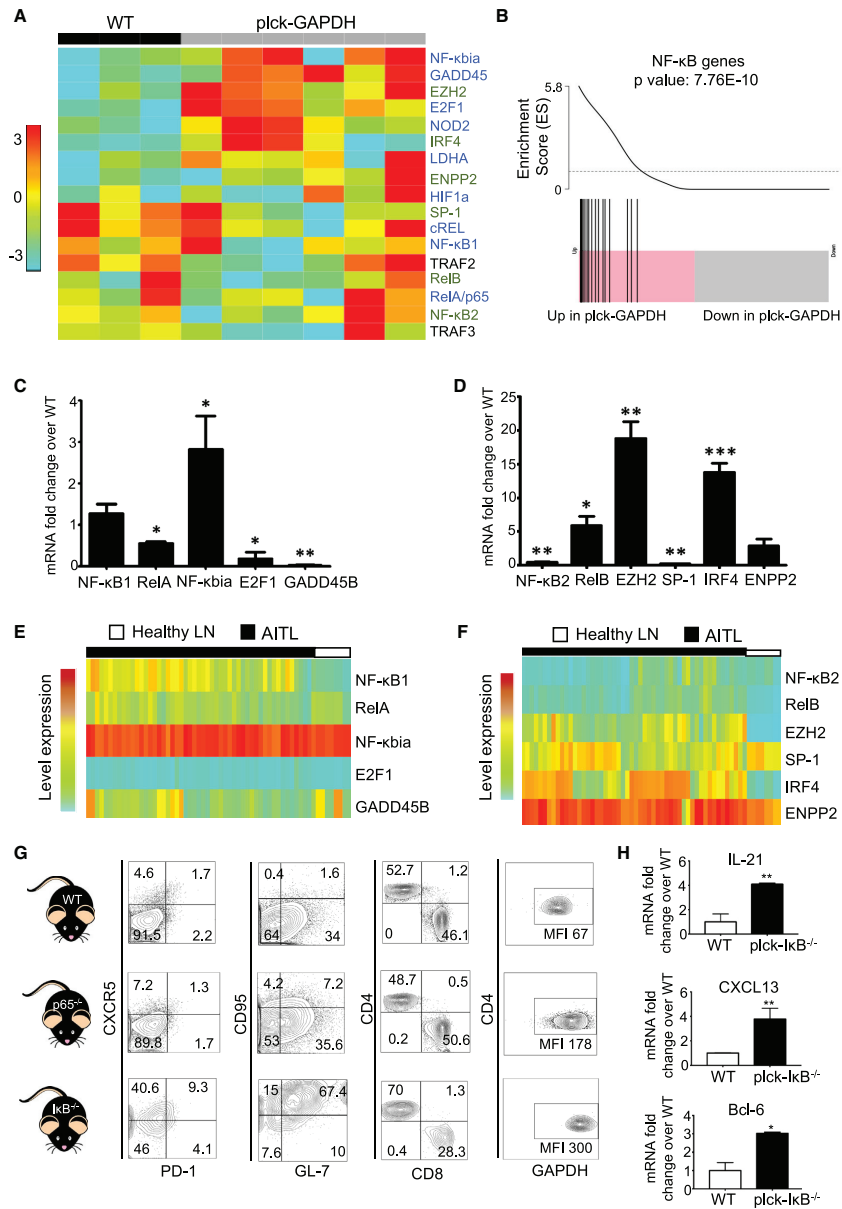


Figure 7. Plck-GAPDH AITL Tumors Show a Strong Activation of the Non-canonical NF-κB Pathway in Tfh Cells
(A) Heatmap for GEA data of canonical (blue) and non-canonical (green) NF-κB pathway and target genes comparing total splenocytes from WT and lymphoma cells from plck-GAPDH mice.

(legend continued on next page)

upon TCR stimulation, whereas healthy CD4⁺ T cells remained unaffected (Figure 8I). The response of each donor sample correlated with the level of NIK expression over healthy CD4⁺ T cells detected, as the hAITL sample expressing low levels of NIK was not affected by the inhibitor (AITL-1 in Figures 8G and 8I). Moreover, the GC B cells in the hAITL samples showed decreased growth upon NIK^{inh} treatment, in agreement with their increased NIK expression (Figures 8H and 8J).

These results support the proposal that drugs targeting the non-canonical NF- κ B pathway represent a potential treatment option for AITL.

DISCUSSION

By overexpressing GAPDH into the T cell lineage, we established here a preclinical plck-GAPDH mouse model of hAITL, a rare T cell lymphoma. AITL is highly resistant to conventional chemotherapy, and prognosis is usually poor with a survival rate of only 30% at 5 years (de Leval et al., 2010; Federico et al., 2013). AITL pathology develops at a later age and is characterized by splenomegaly, hepatomegaly, and enlarged LNs. Moreover, a large number of patients develop a rash and ascites in the abdomen (de Leval et al., 2010). All these features were detected in our mPTCL. Clonal Tfh cell tumor infiltration is one of the hallmarks of hAITL, and Tfh are possibly at the origin of this disease (Crotty, 2014; de Leval et al., 2007; Dupuis et al., 2006; Grogg et al., 2006). However, this T cell component represents only a fraction of the tumor mass and is always accompanied by GC B and/or plasma B cells and FDCs (Gaulard and de Leval, 2014; Mourad et al., 2008). Thus, hAITL is a complex malignancy, in which the tumor microenvironment is a key element. Tfh cells associate with B cells in the GC, where they sustain GC B cell survival and T-B cell connection through ligand-receptor interactions (PD-1-PD-L1, ICOS-ICOSL, FAS-FASL). Remarkably, a cytokine-chemokine secretion pattern was revealed in hAITL (Heissmeyer and Vogel, 2013; Stone et al., 2015; Weber et al., 2015a) and confirmed in our mPTCL. Moreover, our mPTCL manifests autoimmunity-like symptoms consistent with hAITL (de Leval et al., 2007). Most strikingly, GAPDH was increased in AITL patient LNs, stressing the equivalence of our model with AITL. How GAPDH is modulated in such a lymphoma still needs to be unraveled. GAPDH overexpression strongly induced the canonical NF- κ B pathway in the plck-GAPDH thymocytes. This might lead to aberrant T cell development, since NF- κ B is implicated in thymocyte development (Gerondakis et al., 2014; Xing et al., 2016). Moreover, constitutive canonical NF- κ B activation creates an inflammatory context (Hoesel and Schmid,

2013), which might be prosperous for induction of genetic mutations.

In 50%–70% of AITL patients, the Ras homolog gene family member A (*RHOA*) bears a G17V mutation (Palomero et al., 2014; Sakata-Yanagimoto et al., 2014). This results in the loss of function of the RHOA GTPase and is often associated with TET2 loss-of-function mutations in hAITL (Palomero et al., 2014; Yoo et al., 2014). Genetic mouse models have been proposed to mimic hAITL, such as the TET2-KD mouse (Muto et al., 2014) and the SJL mouse driving T cell lymphoma due to elevated IL-21 levels (Jain et al., 2015). However, both of the models only recapitulate part of hAITL. Recently, two double *TET2*^{-/-} *RHOA*^{G17V} mouse models were generated, recapitulating AITL disease more closely (Cortes et al., 2018; Ng et al., 2018). Strikingly, we also revealed *RHOA* mutations in our murine plck-GAPDH AITL disease model.

The connection between GAPDH overexpression and NF- κ B activation was revealed previously by us (Chiche et al., 2015). NF- κ B deregulation is found in many hematological malignancies (Imbert and Peyron, 2017) and other cancers (De Donatis et al., 2016; Fradet et al., 2004; Karin et al., 2002; Madonna et al., 2012). Importantly, increased NF- κ B activation may induce tumor immune escape and chemotherapy resistance (Burstein and Duckett, 2003; Fujiojka et al., 2012). Therefore, NF- κ B is currently considered an ideal target for cancer therapy, and various NF- κ B inhibitors targeting different pathway components are under development (Shen and Tergaonkar, 2009).

The constitutive canonical NF- κ B activation might have contributed to the activation of the non-canonical pathway in premalignant and malignant plck-GAPDH T cells. This was previously described in LN formation, underlining the interdependence of these two NF- κ B pathways (Alcamo et al., 2002; Lo et al., 2006; Shih et al., 2011). Genetically manipulating the NF- κ B pathway in mice showed the interdependence of the canonical and non-canonical pathways and the importance of the initial induction of the canonical NF- κ B pathway by GAPDH followed by the non-canonical pathway in accelerated Tfh development.

EZH2 is increasingly expressed during the progression of hematopoietic and solid cancers (Bachmann et al., 2006; Chen et al., 2018; Karakashev et al., 2018; Patnaik et al., 2018; Sudo et al., 2005), and overexpression of mutant EZH2 has been recognized in a wide selection of B and T cell lymphoproliferative disorders (Morin et al., 2010; Raaphorst et al., 2000; Sasaki et al., 2011; Sneeringer et al., 2010; Visser et al., 2001). Therefore, considerable effort has been directed toward development of EZH2 inhibitors, but current specific EZH2 inhibitors can

(B) GSEA for the NF- κ B related genes in (A). For all genes with enrichment score >0 (black bars in the pink zone), expression is upregulated. KS test. (C and D) mRNA expression levels in CD4⁺ T cells of plck-GAPDH versus WT mice for the canonical pathway genes (NF- κ B1, RelA) and target genes (NF- κ Bia, E2F1, GADD45) (C) and non-canonical pathway genes (NF- κ B2, RelB) and target genes (EZH2, SP-1, IRF4, ENPP2) (D) (mean \pm SD, n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, Student's t test).

(E and F) Heatmaps of transcriptomic data comparing healthy (n = 8) and hAITL (n = 52) LNs for their NF- κ B canonical pathway genes (NF- κ B1, RelA) and target genes (NF- κ Bia, E2F1, GADD45) (E) and non-canonical pathway genes (NF- κ B2, RelB) and target genes (EZH2, SP-1, IRF4, ENPP2) (F) (healthy, n = 8; AITL, n = 60).

(G) plck-*IkB*^{-/-}, plck-*p65*^{-/-}, and WT mice were sacrificed at 18 months and splenocytes were analyzed by FACS for Tfh markers (PD-1⁺CXCR5⁺ gated on CD4⁺), GC B markers (CD95⁺, GL-7⁺ gated on CD4⁺), CD4⁺/CD8⁺ ratio (gated on CD3⁺), and GAPDH expression.

(H) mRNA expression levels of Tfh signature genes by qPCR in CD4⁺ T splenocytes isolated from plck-*IkB*^{-/-} or WT mice. Expression of WT was set to 1 (mean \pm SD, n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01, Student's t test).

See also Figure S6.

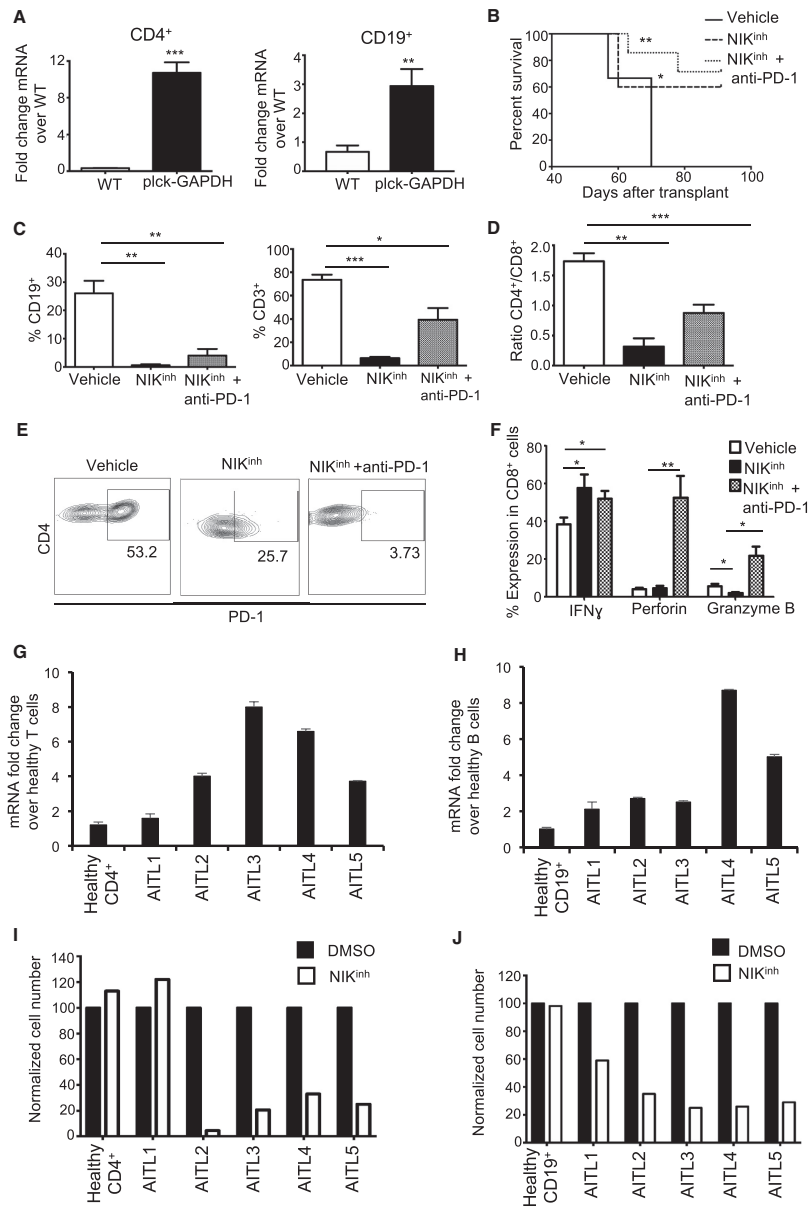


Figure 8. Combining NIK inhibition and Anti-PD-1 Prolongs Survival of the AITL Mouse Model

(A) mRNA expression levels by qPCR of NIK in CD4⁺ T and CD19⁺ B cells from lymphoma developing plck-GAPDH mice compared with cells from WT spleens, set to 1 (mean ± SD, n = 3; **p < 0.01, ***p < 0.001, Student's t test).

(legend continued on next page)

result in either pro-oncogenic or tumor-suppressive effects (Lund et al., 2014). EZH2 inhibitors are catalytic inhibitors that only act on the enzymatic activity of EZH2. By acting on NIK, we can decrease EZH2 at the transcriptional level. Thus, NIK inhibitors would inhibit the catalytic and non-catalytic effect of EZH2. Indeed, EZH2 inhibits IFN γ production at the transcriptional level (Wee et al., 2014), which is essential for the anti-PD-1 response. Moreover, the non-canonical pathway has pro-oncogenic effects by itself, and targeting NIK will decrease EZH2 but also the non-canonical NF- κ B pathway.

We demonstrated that the non-canonical pathway is highly activated in hAITL, equivalent to our mAITL model. Of note, a major component in our murine and human AITL are GC B cells, which also have the non-canonical NF- κ B pathway constitutively activated (Gardam et al., 2008; Sun, 2017; Xie et al., 2007). Of importance, NIK is required for maintaining high expression of ICOSL on B cells, important for Tfh generation (Hu et al., 2011). We confirmed overexpression of NIK in hAITL Tfh cells and GC B cells compared with their healthy counterparts, and the NIK^{inh} strongly increased survival of our mAITL preclinical model. Altogether, this argues strongly for interference with the non-canonical NF- κ B pathway as a treatment for AITL-like disease.

PD-1 is a checkpoint receptor that upon engagement by PD-L1 dampens T cell effector functions and protects cancer cells from immune-mediated attack (Kleffel et al., 2015; Topalian et al., 2012). Thus, antibodies targeting the interaction between PD-1 and PD-L1 have been developed and are currently used clinically in treating cancer patients (Postow et al., 2015; Topalian et al., 2016; Weber et al., 2015b). Anti-PD-1 treatment led to a decrease in CD4⁺ T cells in engrafted plck-GAPDH tumors and boosted CD8⁺ T cell activity. As for melanoma, the Tfh cancer cells might also be directly targeted by anti-PD-1 by a cell-intrinsic mechanism (Kleffel et al., 2015).

Treatment with NIK^{inh} induced IFN γ secretion, which might augment the response to the anti-PD-1 immunotherapy (Fu et al., 2014; Guo et al., 2015). Moreover, IFN γ derived from cytotoxic lymphocytes enhances their motility and cytotoxicity (Bhat et al., 2017). However, combining NIK^{inh} with anti-PD-1 treatment did not further increase survival compared with NIK^{inh} alone. The double treatment did result in CD4⁺ T cells, which were devoid of PD-1 expression, in contrast to the residual CD4⁺ T cell upon NIK^{inh} alone, which still expressed PD-1.

Importantly, NIK^{inh} treatment inhibited growth of hAITL CD4⁺ Tfh and GC B cells *ex vivo*, further emphasizing the role of the

non-canonical NF- κ B pathway in hAITL and the relevance of NIK inhibition for this disease that is in need of better optimized therapies.

In summary, we have established that plck-GAPDH mice develop AITL, recapitulating the pathology, the transcriptional profile and genetic and immune-phenotypic features of hAITL. This mAITL model will help to unravel the possible origin of the disease and pathways implicated and will permit us to test therapeutic options. Here, we provide evidence for the potential utility of immunotherapies and small-molecule inhibitors of NIK, and combinations thereof, for treating AITL.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mice
 - Cells
- METHOD DETAILS
 - Western Blot Analysis
 - Immunoprecipitation
 - Flow Cytometry and Antibodies
 - Isolation of Primary Mouse T Cells
 - Detection of TCR-Signaling
 - Immunohistochemistry Analysis and Antibodies
 - Detection of T Cell Clonality
 - Cytokine-Chemokine Array
 - Quantification of Cytokines in Mouse Serum
 - Transcriptomic Analysis
 - PCR Amplification and Sanger Sequencing
 - Determination of GTP Levels Loaded on RHOA
 - *In Vitro* Tfh Differentiation
 - Germinal Center Induction *In Vivo*
 - Reverse Transcriptase Quantitative-PCR (RT-qPCR) Analysis
 - Genomic DNA Isolation
 - Whole Exome Sequencing
 - Lactate and Glucose Measurement
 - Metabolic Assays
 - 2-NBDG Uptake
 - IgG Determination in Mouse Serum

(B) Splenic lymphoma cells from plck-GAPDH mice were injected intravenously into recipient NSG mice (n = 18), which were treated with vehicle (n = 5), an NIK inhibitor (NIK^{inh}; n = 6), and NIK^{inh} + anti-PD-1 (n = 7). Survival curves for mice are shown. Mice were sacrificed at 90 days post transplant (**p < 0.01, *p < 0.05, Mantel-Cox test).

(C) Percentage of B cells (CD19⁺) and T cells (CD3⁺) in the spleen per total mononuclear cells for the indicated treatment groups at sacrifice (mean \pm SD, n = 4; ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05, one-way ANOVA).

(D and E) Ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells (D) and percentage of PD-1^{high} CD4⁺ T cells (E) in the spleen for the indicated treatment groups at sacrifice (mean \pm SD, n = 4; ***p < 0.001, **p < 0.01, one-way ANOVA).

(F) Splenocytes isolated from NIK^{inh}, NIK^{inh} + anti-PD-1, and control-treated NSG mice at sacrifice were activated for 5 h with PMA/ionomycin, then surface-stained for CD8 followed by intracellular staining for IFN γ , perforin, and granzyme B (mean \pm SD, n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, one-way ANOVA).

(G and H) Fold-change mRNA expression levels by qPCR analysis of NIK in human CD4⁺ T cells (G) and GC B cells (H) isolated from LN biopsies from five different AITL patients and in healthy human counterparts, for which expression level was set to 1 (mean \pm SD, analysis was performed in triplicate for each AITL sample).

(I and J) Effect of NIK^{inh} (10 μ M, 48 h) on the cell number of CD4⁺ T cells (I) and GC B cells (J) of LN biopsies from five different AITL patients upon TCR stimulation compared with TCR-stimulated healthy CD4⁺ human T cells and healthy B cells. Cell numbers are normalized to the corresponding DMSO-treated control cells. See also Figures S7 and S8.

- Measurement of GAPDH Activity
- Cell Proliferation Detection
- Anti-nuclear Antibody Detection
- ADP-Glo Experiments
- Biotin Conjugated Drug Affinity Precipitation
- Comparison of NF- κ B and NIK Knock-down by siRNA Treatment and NIK Inhibitor Treatment
- DATA AND CODE AVAILABILITY
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.008>.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge animal and confocal facilities at the C3M (INSERM U1065, Nice, France). This work was supported by the 'Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer' and the 'Agence Nationale de la Recherche' (Labex SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01), the Canceropôle PACA, Institut National Du Cancer (INCA) and Conseil Régional PACA, and the French Ministry of Research. L.M. was supported by 'la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)' and 'Aides individuelles aux jeunes chercheur ville de Nice'. R.M. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research. RNA-seq experiments were performed at the UCAGenomiX (IPMC), Sophia-Antipolis, Nice, France. Sequencing at UCAGenomiX (IPMC), a partner of the National Infrastructure France Génomique, was supported by Commissariat aux Grands Investissements (ANR-10-INBS-09-03, ANR-10-INBS-09-02) and Canceropôle PACA. We thank the platform of Experimental Histopathology at INSERM/UPS US006 CREFRE, Toulouse Purpan, France. For bioinformatics analysis we thank Nicolas Nottet (C3M, INSERM U1065, Nice, France). For cloning we thank Patrick Munro. hAITL cells were obtained from the INCA labeled Tumorotek of Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E. Verhoeyen coordinated the project, designed and performed experiments, analyzed and discussed the data, and wrote the manuscript; J.-E.R. designed experiments and wrote the manuscript; L.M., R.M., and G.M.D.D. designed and performed experiments, analyzed and discussed the data, and wrote the manuscript; M.T., C.P., L.B., A.D., F. Luciano, J.G.N., L.S., N.F., F.C., J.C., M.J., V.I., E.P., C.R.-P., J.P.B., F.M., S.M., and E. Villa performed experiments, analyzed the data, and discussed results. V.A., P.G., and F. Lemonnier provided AITL patient cells and discussed the data; P.D. and A.R.M. synthesized anti-NIK inhibitors and discussed results; J.-F.P., L.G., R.B., J.-J.F., and T.P. provided critical discussions and reading of the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

NIK inhibitor compounds are under licensing by YUKIN therapeutics. R.B. and T.P. are co-founders of YUKIN therapeutics. The remaining authors declare no competing interests.

Received: May 1, 2018

Revised: April 17, 2019

Accepted: July 26, 2019

Published: August 22, 2019

REFERENCES

Ahsanuddin, A.N., Brynes, R.K., and Li, S. (2011). Peripheral blood polyclonal plasmacytosis mimicking plasma cell leukemia in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: report of 3 cases and review of the literature. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**, 416–420.

Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L.C., Rennert, P.D., Hynes, R.O., and Baltimore, D. (2002). Requirement for the NF- κ B family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* **195**, 233–244.

Algul, H., Treiber, M., Lesina, M., Nakhai, H., Saur, D., Geisler, F., Pfeifer, A., Paxian, S., and Schmid, R.M. (2007). Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **117**, 1490–1501.

Bachmann, I.M., Halvorsen, O.J., Collett, K., Stefansson, I.M., Straume, O., Haukaas, S.A., Salvesen, H.B., Otte, A.P., and Akslen, L.A. (2006). EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J. Clin. Oncol.* **24**, 268–273.

Balmer, M.L., Ma, E.H., Bantug, G.R., Grahler, J., Pfister, S., Glatzer, T., Jauch, A., Dimeloe, S., Slack, E., Dehio, P., et al. (2016). Memory CD8(+) T cells require increased concentrations of acetate induced by stress for optimal function. *Immunity* **44**, 1312–1324.

Bhat, P., Leggett, G., Waterhouse, N., and Frazer, I.H. (2017). Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* **8**, e2836.

Burstein, E., and Duckett, C.S. (2003). Dying for NF- κ B? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 732–737.

Chaffin, K.E., Beals, C.R., Wilkie, T.M., Forbush, K.A., Simon, M.I., and Perlmutter, R.M. (1990). Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO J.* **9**, 3821–3829.

Chang, C.H., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Jr., Faubert, B., Villarino, A.V., O'Sullivan, D., Huang, S.C., van der Windt, G.J., Blagih, J., Qiu, J., et al. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **153**, 1239–1251.

Chen, Z., Yang, P., Li, W., He, F., Wei, J., Zhang, T., Zhong, J., Chen, H., and Cao, J. (2018). Expression of EZH2 is associated with poor outcome in colorectal cancer. *Oncol. Lett.* **15**, 2953–2961.

Chiche, J., Pommier, S., Beneteau, M., Mondragon, L., Meynet, O., Zunino, B., Mouchotte, A., Verhoeyen, E., Guyot, M., Pages, G., et al. (2015). GAPDH enhances the aggressiveness and the vascularization of non-Hodgkin's B lymphomas via NF- κ B-dependent induction of HIF-1 α . *Leukemia* **29**, 1163–1176.

Cildir, G., Low, K.C., and Tergaonkar, V. (2016). Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease. *Trends Mol. Med.* **22**, 414–429.

Colell, A., Green, D.R., and Ricci, J.E. (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ.* **16**, 1573–1581.

Colell, A., Ricci, J.E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W., et al. (2007). GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* **129**, 983–997.

Cortes, J.R., Ambesi-Impiombato, A., Couronne, L., Quinn, S.A., Kim, C.S., da Silva Almeida, A.C., West, Z., Belver, L., Martin, M.S., Scourzic, L., et al. (2018). RHOA G17V induces T follicular helper cell specification and promotes lymphomagenesis. *Cancer Cell* **33**, 259–273.e7.

Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**, 529–542.

De Donatis, G.M., Le Pape, E., Pierron, A., Cheil, Y., Hofman, V., Hofman, P., Allegra, M., Zahaf, K., Bahadoran, P., Rocchi, S., et al. (2016). NF- κ B2 induces senescence bypass in melanoma via a direct transcriptional activation of EZH2. *Oncogene* **35**, 2735–2745.

de Leval, L., Gisselbrecht, C., and Gaulard, P. (2010). Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **148**, 673–689.

de Leval, L., Rickman, D.S., Thielen, C., Reynes, A., Huang, Y.L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Briere, J., Molina, T., et al. (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* **109**, 4952–4963.

- DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **43**, 491–498.
- Dimeloe, S., Mehling, M., Frick, C., Loeliger, J., Bantug, G.R., Sauder, U., Fischer, M., Belle, R., Develiglu, L., Tay, S., et al. (2016). The immune-metabolic basis of effector memory CD4⁺ T cell function under hypoxic conditions. *J. Immunol.* **196**, 106–114.
- Dupuis, J., Boye, K., Martin, N., Copie-Bergman, C., Plonquet, A., Fabiani, B., Baglin, A.C., Haioun, C., Delfau-Larue, M.H., and Gaulard, P. (2006). Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 490–494.
- Federico, M., Rudiger, T., Bellei, M., Nathwani, B.N., Luminari, S., Coiffier, B., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Savage, K.J., et al. (2013). Clinicopathologic characteristics of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: analysis of the international peripheral T-cell lymphoma project. *J. Clin. Oncol.* **31**, 240–246.
- Fradet, V., Lessard, L., Begin, L.R., Karakiewicz, P., Masson, A.M., and Saad, F. (2004). Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8460–8464.
- Fu, J., Malm, I.J., Kadayakkara, D.K., Levitsky, H., Pardoll, D., and Kim, Y.J. (2014). Preclinical evidence that PD1 blockade cooperates with cancer vaccine TEGVAX to elicit regression of established tumors. *Cancer Res.* **74**, 4042–4052.
- Fujioka, S., Son, K., Onda, S., Schmidt, C., Scrabas, G.M., Okamoto, T., Fujita, T., Chiao, P.J., and Yanaga, K. (2012). Desensitization of NFkappaB for overcoming chemoresistance of pancreatic cancer cells to TNF-alpha or paclitaxel. *Anticancer Res.* **32**, 4813–4821.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G., and Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 829–846.
- Gao, X., Wang, X., Pham, T.H., Feuerbacher, L.A., Lubos, M.L., Huang, M., Olsen, R., Mushagian, A., Slawson, C., and Hardwidge, P.R. (2013). NieB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF-kappaB activation. *Cell Host Microbe* **13**, 87–99.
- Gardam, S., Sierro, F., Basten, A., Mackay, F., and Brink, R. (2008). TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity* **28**, 391–401.
- Gaulard, P., and de Leval, L. (2014). The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. *Semin. Cancer Biol.* **24**, 49–60.
- Gerondakis, S., Fulford, T.S., Messina, N.L., and Grumont, R.J. (2014). NF-kappaB control of T cell development. *Nat. Immunol.* **15**, 15–25.
- Grinberg-Bleyer, Y., Oh, H., Desrichard, A., Bhatt, D.M., Caron, R., Chan, T.A., Schmid, R.M., Klein, U., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2017). NF-kappaB c-Rel is crucial for the regulatory T cell immune checkpoint in cancer. *Cell* **170**, 1096–1108.e13.
- Grogg, K.L., Attygalle, A.D., Macon, W.R., Remstein, E.D., Kurtin, P.J., and Dogan, A. (2006). Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod. Pathol.* **19**, 1101–1107.
- Guo, Z., Wang, H., Meng, F., Li, J., and Zhang, S. (2015). Combined Trabectedin and anti-PD1 antibody produces a synergistic antitumor effect in a murine model of ovarian cancer. *J. Transl. Med.* **13**, 247.
- Heissmeyer, V., and Vogel, K.U. (2013). Molecular control of Tfh cell differentiation by Roquin family proteins. *Immunol. Rev.* **253**, 273–289.
- Hoesele, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86.
- Hu, H., Wu, X., Jin, W., Chang, M., Cheng, X., and Sun, S.C. (2011). Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **108**, 12827–12832.
- Imbert, V., and Peyron, J.F. (2017). NF-kappaB in hematological malignancies. *Biomedicines* **5**, <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020027>.
- Iqbal, J., Wright, G., Wang, C., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Smith, L., Guo, S., Wilcox, R.A., et al. (2014). Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood* **123**, 2915–2923.
- Jacquin, M.A., Chiche, J., Zunino, B., Beneteau, M., Meynet, O., Pradelli, L.A., Marchetti, S., Cornille, A., Carles, M., and Ricci, J.E. (2013). GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death. *Cell Death Differ.* **20**, 1043–1054.
- Jain, S., Chen, J., Nicolae, A., Wang, H., Shin, D.M., Adkins, E.B., Sproule, T.J., Leeth, C.M., Sakai, T., Kovalchuk, A.L., et al. (2015). IL-21-driven neoplasms in SJL mice mimic some key features of human angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* **185**, 3102–3114.
- Jimi, E., Strickland, I., Voll, R.E., Long, M., and Ghosh, S. (2008). Differential role of the transcription factor NF-kappaB in selection and survival of CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes. *Immunity* **29**, 523–537.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* **325**, 1006–1010.
- Kakiuchi, M., Nishizawa, T., Ueda, H., Gotoh, K., Tanaka, A., Hayashi, A., Yamamoto, S., Tatsuno, K., Katoh, H., Watanabe, Y., et al. (2014). Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat. Genet.* **46**, 583–587.
- Karakashev, S., Zhu, H., Wu, S., Yokoyama, Y., Bitler, B.G., Park, P.H., Lee, J.H., Kossenkov, A.V., Gaonkar, K.S., Yan, H., et al. (2018). CARM1-expressing ovarian cancer depends on the histone methyltransferase EZH2 activity. *Nat. Commun.* **9**, 631.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 301–310.
- Kleffel, S., Posch, C., Barthel, S.R., Mueller, H., Schlapbach, C., Guenova, E., Elco, C.P., Lee, N., Juneja, V.R., Zhan, Q., et al. (2015). Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth. *Cell* **162**, 1242–1256.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482.
- Lavallard, V.J., Pradelli, L.A., Paul, A., Beneteau, M., Jacquet, A., Auberger, P., and Ricci, J.E. (2009). Modulation of caspase-independent cell death leads to resensitization of imatinib mesylate-resistant cells. *Cancer Res.* **69**, 3013–3020.
- Li, B., and Dewey, C.N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760.
- Liberti, M.V., Dai, Z., Wardell, S.E., Baccile, J.A., Liu, X., Gao, X., Baldi, R., Mehrmohamadi, M., Johnson, M.O., Madhukar, N.S., et al. (2017). A predictive model for selective targeting of the Warburg effect through GAPDH inhibition with a natural product. *Cell Metab.* **26**, 648–659.e8.
- Lo, J.C., Basak, S., James, E.S., Quiambo, R.S., Kinsella, M.C., Alegre, M.L., Weih, F., Franzoso, G., Hoffmann, A., and Fu, Y.X. (2006). Coordination between NF-kappaB family members p50 and p52 is essential for mediating LTbetaR signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues. *Blood* **107**, 1048–1055.
- Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2009). Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* **31**, 921–931.
- Lund, K., Adams, P.D., and Copland, M. (2014). EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* **28**, 44–49.
- Madonna, G., Ullman, C.D., Gentile, G., Palmieri, G., and Ascierto, P.A. (2012). NF-kappaB as potential target in the treatment of melanoma. *J. Transl. Med.* **10**, 53.
- Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010).

- Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 42, 181–185.
- Mourad, N., Mounier, N., Briere, J., Raffoux, E., Delmer, A., Feller, A., Meijer, C.J., Emile, J.F., Bouabdallah, R., Bosly, A., et al. (2008). Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood* 111, 4463–4470.
- Muto, H., Sakata-Yanagimoto, M., Nagae, G., Shiozawa, Y., Miyake, Y., Yoshida, K., Enami, T., Kamada, Y., Kato, T., Uchida, K., et al. (2014). Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. *Blood Cancer J.* 4, e264.
- Nagata, Y., Kontani, K., Enami, T., Kataoka, K., Ishii, R., Totoki, Y., Kataoka, T.R., Hirata, M., Aoki, K., Nakano, K., et al. (2016). Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 127, 596–604.
- Nagoshi, H., Kuroda, J., Kobayashi, T., Maegawa, S., Chinen, Y., Kiyota, M., Nakayama, R., Mizutani, S., Shimura, Y., Yamamoto-Sugitani, M., et al. (2013). Clinical manifestation of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with exuberant plasmacytosis. *Int. J. Hematol.* 98, 366–374.
- Ng, S.Y., Brown, L., Stevenson, K., deSouza, T., Aster, J.C., Louissaint, A., Jr., and Weinstein, D.M. (2018). RhoA G17V is sufficient to induce autoimmunity and promotes T-cell lymphomagenesis in mice. *Blood* 132, 935–947.
- Palomero, T., Couronne, L., Khiabanian, H., Kim, M.Y., Ambesi-Impiombato, A., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Abate, F., Allegretta, M., Haydu, J.E., et al. (2014). Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat. Genet.* 46, 166–170.
- Patnaik, M.M., Vallapureddy, R., Lasho, T.L., Hoversten, K.P., Finke, C.M., Ketterling, R., Hanson, C., Gangat, N., and Tefferi, A. (2018). EZH2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia cluster with ASXL1 mutations and their co-occurrence is prognostically detrimental. *Blood Cancer J.* 8, 12.
- Pearce, E.J., and Pearce, E.L. (2018). Immunometabolism in 2017: driving immunity: all roads lead to metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 81–82.
- Postow, M.A., Callahan, M.K., and Wolchok, J.D. (2015). Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 33, 1974–1982.
- Raaphorst, F.M., van Kemenade, F.J., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K.M., Satijn, D.P., Otte, A.P., and Meijer, C.J. (2000). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 157, 709–715.
- Recalclin, T., and Fear, D.J. (2016). Transcription factors regulating B cell fate in the germinal centre. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 65–75.
- Ren, X.D., and Schwartz, M.A. (2000). Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.* 325, 264–272.
- Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L., and Peyrat, J.P. (2000). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* 36, 1038–1042.
- Rohde, M., Richter, J., Schlesner, M., Betts, M.J., Claviez, A., Bonn, B.R., Zimmermann, M., Damm-Welk, C., Russell, R.B., Borkhardt, A., et al. (2014). Recurrent RHOA mutations in pediatric Burkitt lymphoma treated according to the NHL-BFM protocols. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 911–916.
- Roth, R.B., Hevezi, P., Lee, J., Willhite, D., Lechner, S.M., Foster, A.C., and Zlotnik, A. (2006). Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics* 7, 67–80.
- Rupec, R.A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., Flaig, M.J., Moosmann, S., Plewig, G., Dorken, B., et al. (2005). Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. *Immunity* 22, 479–491.
- Sakata-Yanagimoto, M., Enami, T., Yoshida, K., Shiraiishi, Y., Ishii, R., Miyake, Y., Muto, H., Tsuyama, N., Sato-Otsubo, A., Okuno, Y., et al. (2014). Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 46, 171–175.
- Sasaki, D., Imaizumi, Y., Hasegawa, H., Osaka, A., Tsukasaki, K., Choi, Y.L., Mano, H., Marquez, V.E., Hayashi, T., Yanagihara, K., et al. (2011). Overexpression of Enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica* 96, 712–719.
- Shen, H.M., and Tergaonkar, V. (2009). NF-kappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis* 14, 348–363.
- Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., and Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29, 308–311.
- Shih, V.F., Tsui, R., Caldwell, A., and Hoffmann, A. (2011). A single NF-kappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 21, 86–102.
- Sneeringer, C.J., Scott, M.P., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Pollock, R.M., Richon, V.M., and Copeland, R.A. (2010). Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 20980–20985.
- Stone, E.L., Pepper, M., Katayama, C.D., Kerdiles, Y.M., Lai, C.Y., Emslie, E., Lin, Y.C., Yang, E., Goldrath, A.W., Li, M.O., et al. (2015). ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXP1 to promote Tfh cell differentiation. *Immunity* 42, 239–251.
- Sudo, T., Utsunomiya, T., Mimori, K., Nagahara, H., Ogawa, K., Inoue, H., Wakiyama, S., Fujita, H., Shirouzu, K., and Mori, M., et al. (2005). Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 92, 1754–1758.
- Sun, S.C. (2017). The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545–558.
- Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2012). Targeting the PD-1/B7-1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 207–212.
- Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A., and Pardoll, D.M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 16, 275–287.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304, 104–107.
- Vallois, D., Dobay, M.P., Morin, R.D., Lemonnier, F., Missiaglia, E., Juilland, M., Iwaszkiewicz, J., Fataccioli, V., Bisig, B., Roberti, A., et al. (2016). Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood* 128, 1490–1502.
- Vasanthakumar, A., Liao, Y., Teh, P., Pascutti, M.F., Oja, A.E., Garnham, A.L., Gloury, R., Tempny, J.C., Sidwell, T., Cuadrado, E., et al. (2017). The TNF receptor superfamily-NF-kappaB axis is critical to maintain effector regulatory T cells in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Cell Rep.* 20, 2906–2920.
- Visser, H.P., Gunster, M.J., Kluin-Nelemans, H.C., Manders, E.M., Raaphorst, F.M., Meijer, C.J., Willemze, R., and Otte, A.P. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 112, 950–958.
- Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 38, e164.
- Weber, B.S., Ly, P.M., Irwin, J.N., Pukatzki, S., and Feldman, M.F. (2015a). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, 9442–9447.
- Weber, J.S., D'Angelo, S.P., Minor, D., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N.I., Miller, W.H., Jr., Lao, C.D., et al. (2015b). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 16, 375–384.
- Wee, Z.N., Li, Z., Lee, P.L., Lee, S.T., Lim, Y.P., and Yu, Q. (2014). EZH2-mediated inactivation of IFN-gamma-JAK-STAT1 signaling is an effective therapeutic target in MYC-driven prostate cancer. *Cell Rep.* 8, 204–216.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell* 7, 401–409.
- Xie, P., Stunz, L.L., Larison, K.D., Yang, B., and Bishop, G.A. (2007). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity* 27, 253–267.

- Xing, Y., Wang, X., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2016). Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-kappaB and tonic type I interferon signaling. *Nat. Immunol.* 17, 565–573.
- Xu, H., Wang, X., Lackner, A.A., and Veazey, R.S. (2014). PD-1(HIGH) follicular CD4 T helper cell subsets residing in lymph node germinal centers correlate with B cell maturation and IgG production in Rhesus macaques. *Front. Immunol.* 5, 85.
- Xu, Y., Chaudhury, A., Zhang, M., Savoldo, B., Metelitsa, L.S., Rodgers, J., Yustein, J.T., Neilson, J.R., and Dotti, G. (2016). Glycolysis determines dichotomous regulation of T cell subsets in hypoxia. *J. Clin. Invest.* 126, 2678–2688.
- Yoo, H.Y., Sung, M.K., Lee, S.H., Kim, S., Lee, H., Park, S., Kim, S.C., Lee, B., Rho, K., Lee, J.E., et al. (2014). A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 46, 371–375.
- Zehir, A., Benayed, R., Shah, R.H., Syed, A., Middha, S., Kim, H.R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S.M., et al. (2017). Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat. Med.* 23, 703–713.

B. Posters et communications orales

1. Posters

ESPCR, Rennes, 2018

Identification of a new gene involved in human skin pigmentation : CLEC12B

Laura SORMANI LE BOURHIS¹, Els VERHOEYEN², Rana MHAIDL², Meri K. TULIC¹, Claire REGAZZETTI¹, Gian Marco DE DONATIS¹, Henri MONTAUDIE¹, Stéphane ROCCHI¹, Thierry PASSERON^{1,2}

¹ Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) - UNS - INSERM U1065 – Nice – France
² Université Côte d'Azur, Centre hospitalier universitaire Nice, Department of Dermatology, Nice, France

Introduction

Pigmentary disorders are one of the most frequent skin issues in the world. Unfortunately, although therapeutic demand is very high, effective treatments are limited. Therefore, it is necessary to find new therapeutic targets. In a recent transcriptome analysis we identified a gene called CLEC12B which is only expressed in non-lesional and not in lesional skin of vitiligo patients. The decreased expression of CLEC12B in lesional skin of vitiligo patients is comparable to the one observed for key melanocytic genes such as PMEL17, DCT or tyrosinase suggesting that CLEC12B could be an important melanocytic gene. CLEC12B is a member of the C-type lectin family which are transmembrane receptors that bind carbohydrates and possess an ITIM domain which can recruit phosphatases. To date, little data is available on this gene. Ligand and downstream signaling of CLEC12B are unknown and, until now, no link has been reported between CLEC12B and pigmentation.

Background results

1. Transcriptional analysis reveals the decreased expression of CLEC12B in lesional skin compared to non-lesional skin of vitiligo patients.

Clinical study design

Figure 1 : CLEC12B, a new gene discovered by a transcriptional analysis of vitiligo skin.
(A) 4-mm skin biopsy was taken from patient with vitiligo in lesional skin (free of melanocytes) and in non-lesional skin located in the same area but at least 3 cm from a depigmented lesion.
(B) Transcriptomic analysis highlights top 10 downregulated genes in lesional skin compared to non-lesional skin.

Results

2. CLEC12B is highly expressed by melanocytes in human skin

Figure 2 : Expression of CLEC12B in the human skin.
CLEC12B mRNA (A) and protein (B) expression was examined in the 3 main cell types of the human skin (keratinocytes, fibroblasts and melanocytes obtained from foreskin of young children undergoing circumcision). Immunofluorescent staining performed on human skin samples taken from abdominoplasty shows a colocalization (yellow) of CLEC12B (green) with MITF (red), a melanocyte-specific transcription factor

3. CLEC12B modulates melanogenesis

Figure 3 : Effects of CLEC12B on melanogenesis in normal human melanocytes.
Lentiviral infection was used to silence (A,B) or overexpress (C,D) CLEC12B in normal human melanocytes. Infection was performed with MOI of 20. The variation of pigmentation observed was semi quantified using a melanin assay. Cells were solubilized in 120 µl of 0.5N NaOH at 80 °C for 1 hour to dissolve melanin. Melanin absorbance was measured spectrophotometrically at 405 nm by using a plate reader. Melanin production was calculated by normalizing the total melanin values with protein content.

4. CLEC12B downregulates MITF and melanogenic protein levels and activity

Figure 4 : Effect of CLEC12B inhibition (A) or overexpression (B) on MITF and melanogenic protein levels (tyrosinase, DCT) and tyrosinase activity (C,D).
Tyrosinase activity was assessed by a tyramide-based tyrosinase assay (TTA) and the intensity of fluorescence was quantitated using ImageJ analysis tools.



5. CLEC12B induce CREB proteosomal degradation

Figure 5: Effect of CLEC12B overexpression on CREB and phospho-CREB protein level (A), CREB mRNA level (B) and CREB proteosomal degradation (C).
Treatment with 1 µM of MG132 (a proteasomal degradation inhibitor) abolished the decrease of CREB protein levels in NHM that overexpressed CLEC12B.


Conclusion

CLEC12B appears as a new melanocytic gene that strongly modulates melanogenesis through CREB proteasomal degradation. These results not only provide a better understanding of the melanocyte biology and regulation of melanogenesis but also suggest that CLEC12B could be a promising target for the development of a new class of depigmenting agents.

Acknowledgements Tissue samples were kindly supplied by the Department of pediatric Surgery, Lenval Hospital (Dr. Kurzenne, Nice, France)
This work was supported by the Conseil général des Alpes Maritimes, INSERM and the University of Nice Sophia Antipolis.

Identification of a new gene involved in human skin pigmentation : CLEC12B



2019 Lilly Scholarship Awardee

Laura SORMANI LE BOURHIS¹, Hélène TAQUIN², Rana MHAIDLY¹, Els VERHOYEN¹, Marjorie HEIM¹, Claire REGAZZETTI¹, Meri K. TULC¹, Yann CHELI¹, Nicolas NOTTET¹, Gian Marco DE DONATIS¹, Anne-Sophie DABERT GAY⁴, Delphine DEBAYLE⁴, Nathalie CARDOT LECCIA³, Henri MONTAUDIE¹, Stéphane ROCCHI¹ & Thierry PASSERON^{1,2}

¹ Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) - UNS - INSERM U1065 - Nice - France
² Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire Nice, Department of Dermatology - Nice - France
³ Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire Nice, Department of Pathology - Nice - France
⁴ Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) - CNRS - CAPABIO Platform - Sophia Antipolis - France

Introduction

Melanogenesis is a complex and tightly regulated process. In a recent transcriptome analysis performed in lesional skin compared to non lesional skin of vitiligo patients, we have identified a new gene called CLEC12B. The decreased expression of CLEC12B in skin lacking melanocytes compared to pigmented skin is comparable to the one observed for key melanogenic enzymes TYR, DCT or TYRP1 suggesting that CLEC12B could be an important melanocytic gene. CLEC12B is a member of the C-type lectin family which are transmembrane receptors that possess an ITIM domain recruiting phosphatases. So far, few data are available on this gene that has only been shown in myeloid cells. Ligand and downstream signaling of CLEC12B are unknown and to date, no link has been reported between CLEC12B and pigmentation.

Background results

1. Transcriptome analysis of vitiligo skin reveals CLEC12B as a new melanocyte specific biomarker

Clinical study design

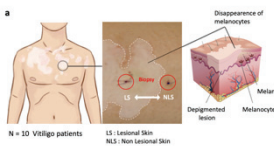


Figure 1 Transcriptome analysis of vitiligo skin highlight the disappearance of melanocytes and reveals CLEC12B (a) 4-mm-skin biopsy was taken from patient with vitiligo in lesional skin (free of melanocytes) and in non-lesional skin located in the same area but at least 3 cm from the depigmented lesion. (b) Transcriptomic analysis highlights top 20 downregulated genes in lesional skin compared to non-lesional skin.

Results

2. CLEC12B is expressed by skin melanocytes

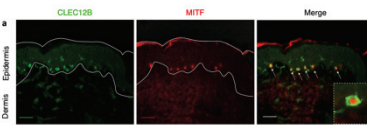


Figure 2 (a) Immunofluorescence staining performed on human skin sample taken from abdominoplasty shows a colocalization (yellow) of CLEC12B (green) with MITF (red). (b) CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR in the 3 main cell types of human skin (keratinocytes, fibroblasts and melanocytes)

3. CLEC12B expression depends on skin phototype

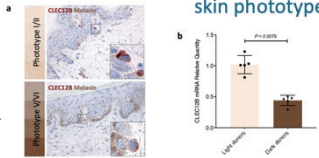


Figure 3 (a) IHC of CLEC12B was performed on phototype I/II and phototype V/VI skin samples. Melanin was visualized as brown and CLEC12B as red stain. (b) CLEC12B mRNA relative expression level was examined by qPCR

4. CLEC12B modulates melanogenesis in vitro

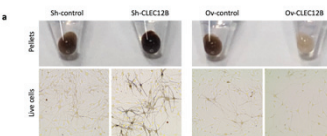


Figure 4 Lentiviral infection was used to silence (sh-CLEC12B) or overexpress CLEC12B (Ov-CLEC12B) in phototype III/IV normal human melanocytes. (a) Pigmentation variation observed in cell pellets and transmitted light microscopy was semi-quantitated using a melanin assay (b) Melanin production was calculated by normalizing the total melanin values with protein content.

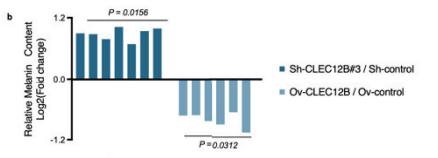


Figure 4 (b) Relative Melanin Content (Log₂ Fold Change) for sh-CLEC12B#3 / Sh-control (P = 0.0156) and Ov-CLEC12B / Ov-control (P = 0.0312)

5. CLEC12B modulates pigmentation in reconstructed human skin

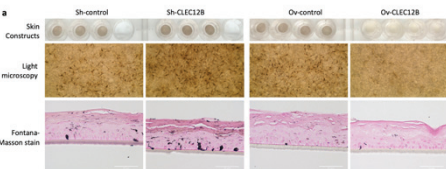


Figure 5 Reconstructed skins were composed of keratinocytes cultured in presence of phototype III/IV melanocytes transduced with lentivirus to silence (Sh-CLEC12B) or to overexpress CLEC12B (Ov-CLEC12B). (a) The variation of pigmentation was observed in skin constructs and by transmitted light microscopy. Melanin pigments were visualized with Fontana-Masson and Eosin stain. (b) Melanin production was assessed using a melanin assay.

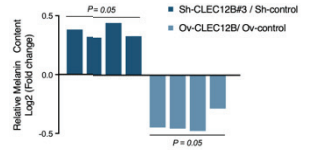
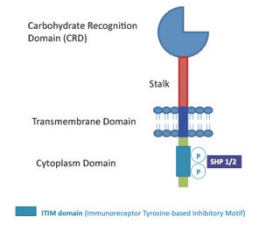


Figure 5 (b) Relative Melanin Content (Log₂ Fold Change) for sh-CLEC12B#3 / Sh-control (P = 0.05) and Ov-CLEC12B / Ov-control (P = 0.05)

6. CLEC12B regulates melanogenesis pathway by recruiting SHP-1 and SHP-2



CLEC12B : C-type Lectin Like Receptor

- Member of the C-type lectin family of transmembrane receptors
- CLEC12B possesses an ITIM domain which can recruit phosphatases like SHP-1 or SHP-2 upon phosphorylation.
- Ligand and downstream signalling of CLEC12B are largely unknown.

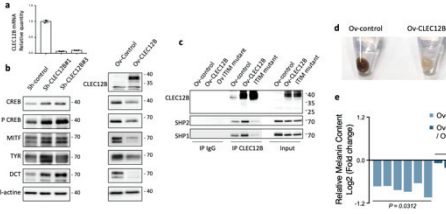


Figure 6 (a) CLEC12B mRNA relative quantity was examined by qPCR. (b) Melanogenic protein expression levels were analysed by WB in Sh-control, Ov-control and Ov-CLEC12B melanocytes. (c) Lentiviral infection was used to overexpress wt CLEC12B (Ov-CLEC12B) or an ITIM mutant of CLEC12B (ITIM mutant) in melanocytes. Lysates were immunoprecipitated using control IgG or anti-CLEC12B antibodies and samples were analysed by WB for co-immunoprecipitated SHP-1 and SHP-2 and CLEC12B. The variation of pigmentation observed in cell pellets (d) was semi-quantitated using a melanin assay (e). WB analysis in Ov-control, Ov-CLEC12B and ITIM mutant transduced melanocytes (f).

Conclusion

CLEC12B appears as a new melanocytic gene that strongly modulates melanogenesis by recruiting SHP-1 and SHP-2. These results not only provides novel insights in the understanding of the melanocyte biology and regulation of melanogenesis but also supports CLEC12B as a promising target for the development of melanogenic agents in the clinic and cosmetic fields.

Acknowledgements

Tissue samples were kindly supplied by the Department of pediatric Surgery, Lenval Hospital (Dr. Kurzenne, Nice, France)
 This works was supported by Conseil général des Alpes Maritimes, INSERM and University of Nice Sophia Antipolis

286

2. Communications orales

19/09/2019 49TH ANNUAL ESDR MEETING

CLEC12B: a new gene regulating the color of skin

25/04/2017 Mediteranean centre for molecular medicine (C3M) Internal Seminar NICE

Identification of a new gene involved in skin pigmentation : CLEC12B

12-14/10/2016 Animator of a scientific stand in "Village des Sciences du parc Valrose, exposition « Science & Expériences »

C. Encadrement d'étudiants

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'encadrer deux médecins durant leur master et thèse en Sciences (1 an chacun), une étudiante en thèse en Tunisie durant un stage de 3 mois et une étudiante en Master durant 6 mois.

11/2015 – 11/2016 Hélène Taquin (MD)	Master student
04/2016 – 07/2016 Amal Maouia	Ph.D Student
11/2016 – 09/2017 Henri Montaudié (MD)	Ph.D student
01/2019 – 06/2019 Lauriane Blot	Master student

Résumé

La mélanogenèse est un processus complexe et étroitement régulé. Une étude transcriptomique à large échelle a été réalisée sur des peaux lésionnelles de patients atteints de vitiligo (dépourvues de mélanocytes et donc de pigmentation) comparées à des peaux non lésionnelles et des peaux de sujets sains. L'analyse différentielle des transcrits a permis la découverte d'un nouveau gène dont l'expression est significativement régulée négativement, dans les peaux lésionnelles, en comparaison avec les peaux non lésionnelles ou saines : *CLEC12B*. Le degré de régulation de *CLEC12B* était similaire à ceux observés pour les enzymes clés de la mélanogenèse (TYR, TYRP1 ou DCT) suggérant que *CLEC12B* pourrait être un gène mélanocytaire important et jouer un rôle, jusqu'ici inconnu, dans la pigmentation cutanée.

CLEC12B est membre de la famille des lectines de type C, qui sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine ITIM capable de recruter et d'activer SHP1 et SHP2. Ces phosphatases régulent de nombreuses voies de signalisation cellulaire impliquées dans des processus biologiques importants. À ce jour, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant CLEC12B qui a uniquement été rapporté dans les cellules myéloïdes. Son ligand, ainsi que les voies de signalisation en aval, n'ont toujours pas été identifiés et aucun lien n'a été rapporté entre CLEC12B et la pigmentation cutanée.

Nous avons montré, pour la première fois, que CLEC12B est exprimé par les mélanocytes humains normaux (NHM) et que son expression dépend du phototype de la peau. La modulation de l'expression de CLEC12B par shRNA induit une augmentation significative de la production de mélanines dans les NHMs. Au contraire, la surexpression de CLEC12B entraîne une diminution significative de la pigmentation. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un modèle d'épiderme humain reconstruit. L'utilisation d'un mutant du domaine ITIM de CLEC12B nous a permis de montrer que CLEC12B recrute et active directement les phosphatases SHP1 et SHP2 dans les mélanocytes. Ceci conduit à la régulation négative des facteurs de transcription CREB et MITF ainsi que des enzymes de la mélanogenèse (TYR, TYRP1 et DCT).

Ce nouvel apport dans la compréhension de la physiologie de la pigmentation cutanée pourrait permettre, *in fine*, à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir un jour au développement d'agents dans le traitement clinique et cosmétique des troubles pigmentaires.

Mots clefs : CLEC12B, pigmentation cutanée, mélanogenèse, SHP1 et SHP2