

L'AMP cyclique est un régulateur de la pigmentation de la peau

**Corine Bertolotto
Rosier Busca
Robert Ballotti
Jean-Paul Ortonne**

La pigmentation de la peau est le mécanisme principal de protection contre les rayonnements ultraviolets solaires et contre la photocarcinogénèse cutanée. Les mélanines sont les principaux pigments responsables de la couleur de la peau. La stimulation photo-induite de la mélanogénèse entraîne un assombrissement de la peau, communément appelé bronzage. Cette capacité au bronzage, associée à la photosensibilité, permet de définir des phototypes qui identifient les sujets à risque pour la photocarcinogénèse cutanée. La voie de l'AMP cyclique paraît jouer un rôle primordial dans le contrôle de la synthèse des mélanines qui implique plusieurs enzymes spécifiques. La liaison des peptides mélanotropes à leurs récepteurs transmembranaires induit une augmentation de l'AMP cyclique intramélanocytaire et une forte augmentation de l'expression de ces enzymes qui stimulent la mélanogénèse. Le décryptage des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mélanogénèse conduit à l'identification de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles et pourrait également permettre une identification plus précise des sujets à risque.

ADRESSES

C. Bertolotto, R. Busca, R. Ballotti : Inserm U. 385, Faculté de médecine de Nice, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. J.P. Ortonne : Inserm U. 385 et Service de dermatologie, PC-Médicaux - Hôpital de l'Archet 2, BP 3079, 06202 Nice Cedex 3, France.

TIRÉS À PART

J.P. Ortonne.

La pigmentation constitutive de la peau résulte de la présence de grains de mélanine dans les kératinocytes épidermiques. Ces grains de pigment sont synthétisés dans des organites intracytoplasmiques, les mélanosomes, par des cellules spécialisées, les mélanocytes, qui les transfèrent alors aux kératinocytes. Le stimulus physiologique de la synthèse des mélanines est le soleil. La mélanogénèse photo-induite entraîne un

assombrissement de la peau correspondant à la pigmentation facultative, communément appelé bronzage. Cette réaction a pour support une augmentation du nombre des mélanocytes résultant de leur prolifération photoinduite, une néosynthèse de mélanines, et des modifications morphologiques des mélanocytes, associant un accroissement de leur dendricité à une augmentation du transfert des mélanosomes aux kératinocytes. Ces modifications induisent

une augmentation de la formation, de la maturation et de la mélanisation des mélanosomes. La capacité au bronzage associée à la photosensibilité (réaction érythémateuse ou « coup de soleil ») permet de définir des phototypes, qui identifient les sujets à risque pour la photocarcinogénèse cutanée. Ces phototypes sont encore exclusivement fondés sur des critères cliniques, mais les fondements d'une classification moléculaire commencent à se dessiner. La mélanogénèse induite par le rayonnement ultraviolet du spectre solaire est considérée comme la principale réaction physiologique de protection contre le photovieillessement et contre la photocarcinogénèse. Ses mécanismes moléculaires sont complexes, impliquant vraisemblablement plusieurs voies de signalisation, mais la voie de l'AMP cyclique paraît jouer un rôle primordial.

La mélanogénèse

La synthèse des mélanines consiste en une série de réactions enzymatiques et spontanées dont le précurseur est la L-tyrosine (figure 1). Trois enzymes principales et spécifiques des mélanocytes participent à la mélanogénèse. Il s'agit de la tyrosinase, de la TRP-1 (*tyrosinase related protein-1*) ou gp75 et de la TRP-2 (*tyrosinase related protein-2*) ou DOPAchrome tautomérase (DCT). TRP-1 et TRP-2 sont surtout impliqués dans la voie de l'eumélanogénèse [1].

Bien que ces enzymes aient une structure similaire, elles sont codées par des gènes distincts et ont des activités enzymatiques différentes. La tyrosinase, codée par le locus *albino* chez la souris, catalyse la transformation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) et de la DOPA en dopaquinone. La TRP-2, codée par le locus *slaty*, possède une activité dopachrome tautomérase, et catalyse la transformation du dopachrome en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA). La TRP-1, localisée au locus *murin brown*, catalyse l'oxydation de la DHICA en acide indole 5,6-quinone-2-carboxylique [1].

Les mélanocytes des mammifères produisent deux types de mélanines : les phéomélanines, pigments jaunes ou rouge-brun, riches en soufre, et les

eumélanines, pigments bruns, noirs, pauvres en soufre. Le rapport eumélanines/phéomélanines dans l'épiderme est variable, mais la présence d'eumélanines est corrélée au niveau de photoprotection de la peau. Les sujets à peau blanche et cheveux roux (phototype 1), dont l'épiderme contient des quantités importantes de phéomélanines, ont un risque élevé de cancers de la peau photo-induits. Plusieurs études réalisées *in vitro* démontrent que les phéomélanines sont très photolabiles et peuvent, après photoexcitation, produire des radicaux libres mutagènes et phototoxiques, contrairement aux eumélanines qui sont photoprotectrices. Ces observations permettraient d'expliquer la photosensibilité extrême de la peau des sujets de phototype 1 au niveau moléculaire, ainsi que leur risque élevé de photocarcinogénèse [2].

Régulation de la mélanogénèse par les hormones mélanotropes

Les mécanismes qui contrôlent la nature biochimique des mélanines produites dans la peau sont donc fondamentaux pour le déterminisme de la photoprotection mélanique. Chez la souris, trois gènes au moins déterminent le rapport eumélanines/phéomélanines dans les mélanocytes folliculaires. Ces gènes codent pour la pro-opiomélanocortine (POMC), le récepteur des mélanocortines de type 1 (MC1R) et la protéine agouti [3]. La POMC est le précurseur des hormones mélanotropes ACTH (adrénocorticotrophie hormone) et α -MSH (*melanocyte stimulating hormone*), qui se lient toutes deux au MC1R. L'activation du MC1R par ses ligands induit une augmentation de la teneur intramélanocytaire en AMPc et stimule l'eumélanogénèse. La protéine agouti est un peptide de 131 acides aminés produit par les mélanocytes folliculaires, et se comporte comme un antagoniste compétitif de l' α -MSH, puisque sa liaison au MC1R empêche l' α -MSH d'augmenter les taux d'AMPc intramélanocytaire et favorise la phéomélanogénèse [4]. Le gène *mahogany*, récemment identifié, code pour un récepteur membranaire homologue de l'attractine humaine [5], et est

également impliqué dans le contrôle de la nature biochimique des mélanines. Chez les souris portant la mutation *lethal-yellow*, une expression ectopique de la protéine agouti mutée réduit l'eumélanogénèse et produit un pelage jaune. Dans ce contexte, les mutations du gène *mahogany*, entraînant la perte de fonction ou l'absence d'expression de la protéine correspondante, permettent la restauration de la voie de l'eumélanogénèse et d'une pigmentation normale (marron). Le rôle et la fonction de la protéine *mahogany* ne sont pas encore élucidés. Sur le plan enzymatique, le passage de l'eumélanogénèse vers la phéomélanogénèse est dû à une inhibition partielle de l'activité de la tyrosinase, et à l'absence presque totale de TRP-1 et de TRP-2, indiquant que l'AMPc ne contrôle pas de manière identique l'expression de ces trois enzymes mélanogéniques.

Le rôle des peptides mélanotropes dans le contrôle de la pigmentation de la peau humaine normale a été mis en question sur la base de plusieurs arguments. Chez l'homme, le lobe intermédiaire de l'hypophyse, lieu du clivage de la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur des hormones mélanotropes, est vestigial. L'hypophyse humaine produit donc peu d' α -MSH et les taux circulants de cette hormone sont très faibles. La mise en évidence récente d'une production locale d'hormones mélanotropes dans la peau conduit à reconsidérer cette question. En effet, le POMC et ses produits de clivage protéolytiques, l' α -MSH et l'ACTH ont été détectés dans la peau [6]. Ces peptides sont produits majoritairement par les kératinocytes, mais également par les mélanocytes et les cellules de Langerhans. La présence dans la peau humaine des proconvertases 1 et 2, qui clivent la POMC respectivement en ACTH et en α -MSH a été mise en évidence par immunohistochimie. En outre, les gènes codant pour le CRH (*corticotropin releasing hormone*) et son récepteur de type 1, CRHR (*corticotropin releasing hormone receptor*), sont exprimés dans la peau humaine [7]. Ces observations suggèrent que, comme dans l'axe hypothalamo-hypophysaire, la boucle de régulation CRH-CRHR-POMC est présente dans la peau.

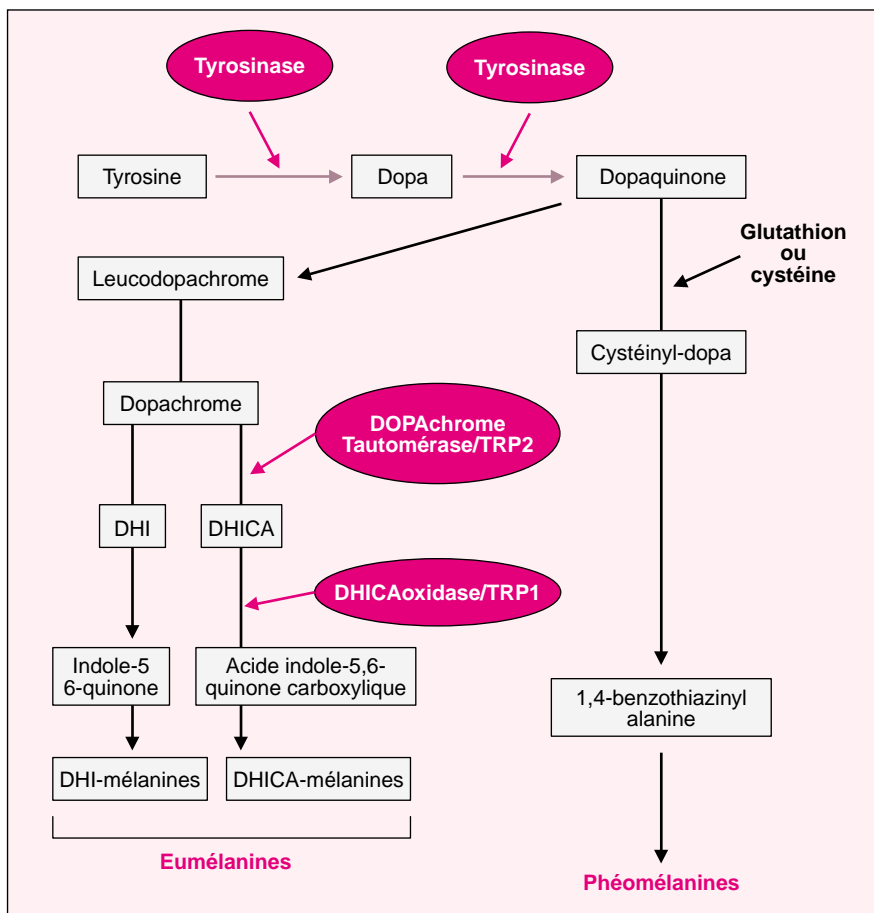


Figure 1. **Voie de synthèse des mélanines.** La synthèse des mélanines consiste en une série de réactions enzymatiques et spontanées dont le précurseur est la L-tyrosine. Trois enzymes principales et spécifiques des mélanocytes participent à la mélanogénèse. Il s'agit de la tyrosinase, de TRP-1 et de TRP-2 ou DOPachrome tautomérase. TRP-1 et TRP-2 jouent un rôle clé dans la voie de l'eumélanogénèse.

L'hyperpigmentation cutanée associée aux maladies d'Addison et de Cushing semble être corrélée à des taux élevés d'ACTH. Un cas d'hyperpigmentation cutanée due à une hypersécrétion d' α -MSH a été récemment décrit [8], et l'injection d'un analogue d' α -MSH à des volontaires sains entraîne une stimulation de la pigmentation. Ces données mettent ainsi en lumière le rôle clé de l' α -MSH et l'ACTH dans la régulation de la pigmentation cutanée chez l'homme.

Les effets de l' α -MSH et l'ACTH sont déclenchés par la liaison de ces hormones au MC1R. Ce récepteur à 7 domaines transmembranaires est couplé à une protéine G de type α , qui active l'adénylate cyclase et aug-

mente la concentration intracellulaire en AMPc. Le MC1R joue un rôle prépondérant dans le déterminisme des phototypes. Chez l'homme, il semble que le phénotype roux soit associé à des mutations du récepteur MC1R, qui entraînent une diminution de l'affinité pour l' α -MSH [9]. Par ailleurs, un autre variant du MC1R a été associé à une susceptibilité au mélanome malin sporadique, mais cette relation semble indépendante du phototype [10]. Plus récemment, des mutations du gène de la POMC ont été décrites chez l'homme, et induisent un phénotype associant une obésité sévère précoce, une insuffisance surrénalienne et des cheveux roux [11].

Rôle de l'AMP cyclique dans la mélanogénèse induite par les hormones mélanotropes

La liaison de l' α -MSH et/ou de l'ACTH au MC1R induit une augmentation de l'AMPc intramélanocytaire, qui stimule la mélanogénèse en augmentant très fortement l'expression du gène de la tyrosinase et de TRP-1. L' α -MSH augmente préférentiellement la synthèse d'eumélanines [12]. Dans les mélanocytes humains normaux en culture, elle induit une augmentation du rapport eumélanines/phéomélanines. De nombreuses données obtenues *in vitro* ont illustré le rôle crucial de l'AMPc dans la régulation de la mélanogénèse. En effet, la mélanogénèse est stimulée par de nombreux agents qui augmentent les taux intracellulaires d'AMPc tels que la forskoline, les prostaglandines et la caféine. En outre, certains signes cliniques de patients atteints du syndrome de McCune-Albright confirment l'importance de l'AMPc dans le contrôle de la pigmentation *in vivo*. Ces patients présentent des taches d'hyperpigmentation et portent une mutation activatrice dans la protéine G α s, entraînant une activation de l'adénylate cyclase et une augmentation des taux intracellulaires en AMPc.

En outre, les effets de l'AMPc sont dus à l'activation de la protéine kinase A (PKA) car l'inhibition de cette kinase bloque les effets mélanogéniques de l' α -MSH [13, 14].

Régulation transcriptionnelle des gènes mélanogéniques

Tous les agents mélanogéniques semblent exercer leurs effets *via* une augmentation de l'expression de la tyrosinase. Les travaux réalisés par notre groupe ont permis de montrer que l'augmentation du taux intracellulaire en AMPc entraînait une stimulation de la transcription du gène de la tyrosinase. La réponse à l'AMPc est contrôlée par deux motifs entourant la boîte TATA: la boîte M (AGT-CATGTGCT) et la boîte E (CATGTG) [14]. L'AMPc stimule également l'activité transcriptionnelle des promoteurs de TRP-1 et de TRP-2,

par le biais d'une boîte M identique à celle du promoteur de la tyrosinase. Une boîte E est également impliquée dans la réponse de TRP-1 à l'AMPc. Une boîte E et un pseudo-site CRE (élément de réponse à l'AMPc) participent à la sensibilité du promoteur de TRP-2 à l'AMPc [14].

Les boîtes M et E contiennent un élément canonique de liaison (CANNTG) des facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice (*helix-loop-helix*, HLH). Cette caractéristique a permis d'orienter la recherche des mécanismes de sa régulation. Ainsi, le facteur de transcription *microphthalmia* se lie spécifiquement aux boîtes M et E des promoteurs des gènes codant pour la tyrosinase, TRP-1 et TRP-2 [13, 14], dont il stimule l'activité transcriptionnelle. Ce facteur a une structure de type HLH avec un domaine à répétition de leucine (*leucine zipper*, LZ). La région basique du côté amino-terminal est responsable de la liaison de la protéine à l'ADN sur une séquence de type CANNTG (boîte E) [15]. *Microphthalmia* possède une grande homologie de structure avec trois autres facteurs de transcription, TFEB, TFE3 et TFEC, dans lesquels se trouve également un domaine transactivateur (DDVID-DIISLES), situé en amont du domaine basique [16]. *Microphthalmia* est impliqué dans le contrôle du développement et de l'homéostasie du système mélanocytaire. Des mutations de l'homologue humain de ce gène induisent le syndrome de Waardenburg de type II (WS 2A), caractérisé par une hypomélanose de la peau, des yeux et des cheveux.

L'inhibition de la fonction de *microphthalmia* par un mutant dominant négatif bloque les effets de l' α -MSH et de l'AMPc sur le promoteur de la tyrosinase, confirmant ainsi que ce facteur est indispensable à la stimulation de la tyrosinase par l'AMPc. Par ailleurs, l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc stimule l'expression de *microphthalmia* dans les mélanocytes humains normaux en culture, et dans les cellules de mélanome de souris B16. L'AMPc règle l'expression du gène *Microphthalmia* au niveau transcriptionnel, *via* un motif CRE situé dans son promoteur, qui n'est fonctionnel que dans les mélanocytes [17].

En résumé, les différentes étapes de la mélanogenèse, induite par l'AMPc, se déroulent de la manière suivante (*figure 2*): (1) l'AMP cyclique, *via* l'activation de la PKA et de CREB, stimule la transcription du gène *Microphthalmia*; (2) celui-ci se fixe aux boîtes E et M, situées dans le promoteur des enzymes mélanogéniques, tyrosinase, TRP-1 et TRP-2, et stimule leur expression; (3) l'augmentation de l'expression de ces enzymes entraîne une augmentation de la synthèse des pigments mélaniques.

L'importance de *microphthalmia* dans la régulation de la pigmentation est également illustrée par son implication dans l'inhibition de la mélanogenèse par le TPA. Cet agent induit en effet une diminution de la liaison de *microphthalmia* à la boîte M du promoteur de la tyrosinase. De même, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des gènes de la tyrosinase, de TRP-1 et de TRP-2 par la protéine agouti, induite par l' α -MSH, est due à une inhibition de l'expression de *microphthalmia* [18].

D'autres facteurs de transcription ont été également impliqués dans la régulation des gènes mélanogéniques, mais leur rôle semble être moins important que celui de *microphthalmia*. En effet, le facteur de transcription BRN2, contenant un domaine POU, inhibe l'activité du promoteur de la tyrosinase probablement en empêchant la liaison de *microphthalmia* sur la boîte M [19]. Le facteur de transcription TBX2, appartenant à la famille de Brachyury, inhibe l'activité du promoteur de TRP-1 en se liant à des éléments spécifiques (MSE) [20]. Ces mêmes éléments lient aussi PAX3, qui stimule l'activité du promoteur de TRP-1 [21]. PAX3 est un facteur de transcription très important pour le développement du système mélanocytaire, dont nous reparlerons ultérieurement. Très récemment, il a été montré que TFE3 et TFEB stimulent l'activité des promoteurs de la tyrosinase et de TRP-1 [22].

En conclusion, si la régulation de l'expression des enzymes mélanogéniques est principalement sous le contrôle de *microphthalmia*, il est évident qu'il existe d'autres mécanismes de régulation dont l'importance reste à déterminer.

Contrôle de l'expression de *microphthalmia*

L'expression de *microphthalmia* est restreinte à un nombre limité de tissus et cellules, tels que le cœur, les mastocytes, les ostéoclastes, les cellules pigmentées de la rétine et les mélanocytes. Il existe au moins 4 formes différentes de ce gène, qui utilisent des promoteurs distincts, et sont caractérisées par un premier exon spécifique [23]. Les mécanismes qui règlent l'expression de la forme spécifique des mélanocytes doivent impliquer une combinaison particulière de protéines mélanocytaires, et les deux facteurs de transcription PAX3 et SOX10 sont d'excellents candidats pour remplir cette fonction. PAX3 est un facteur de transcription caractérisé par une séquence de 128 acides aminés appelée «*paired box*» et un homéodomaine de 60 acides aminés. Des mutations dans le gène PAX3 humain ont été mises en évidence chez des patients atteints des syndromes de Waardenburg de type I ou III, caractérisés par des anomalies pigmentaires et auditives [24]. Récemment, le groupe de Tachibana [25] a pu montrer que Pax3 se lie au promoteur de *microphthalmia* et stimule l'expression de la protéine.

SOX10 est un facteur de transcription cloné et caractérisé récemment, et exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire dans les cellules de la crête neurale. Ce facteur possède un domaine de liaison à l'ADN, ayant une forte homologie structurale avec le domaine HMG (*high mobility group*) du facteur de transcription de détermination sexuelle SRY. Des mutations de SOX10 sont associées au syndrome de Waardenburg de type IV [26]. Tout comme PAX3, SOX10 se fixe et stimule également l'activité du promoteur de *microphthalmia* [27].

Le facteur de transcription LEF-1 joue également un rôle clé dans la régulation de l'expression de *microphthalmia*. Il existe un site de liaison pour LEF-1 dans le promoteur de *microphthalmia*, chez l'homme et chez le poisson zèbre. LEF-1 agit en aval de la voie Wnt et son activité est contrôlée par la β -caténine. LEF-1 et la β -caténine jouent donc un rôle central dans la différenciation mélanocytaire, en réglant l'expression de *microphthalmia* [28, 29].

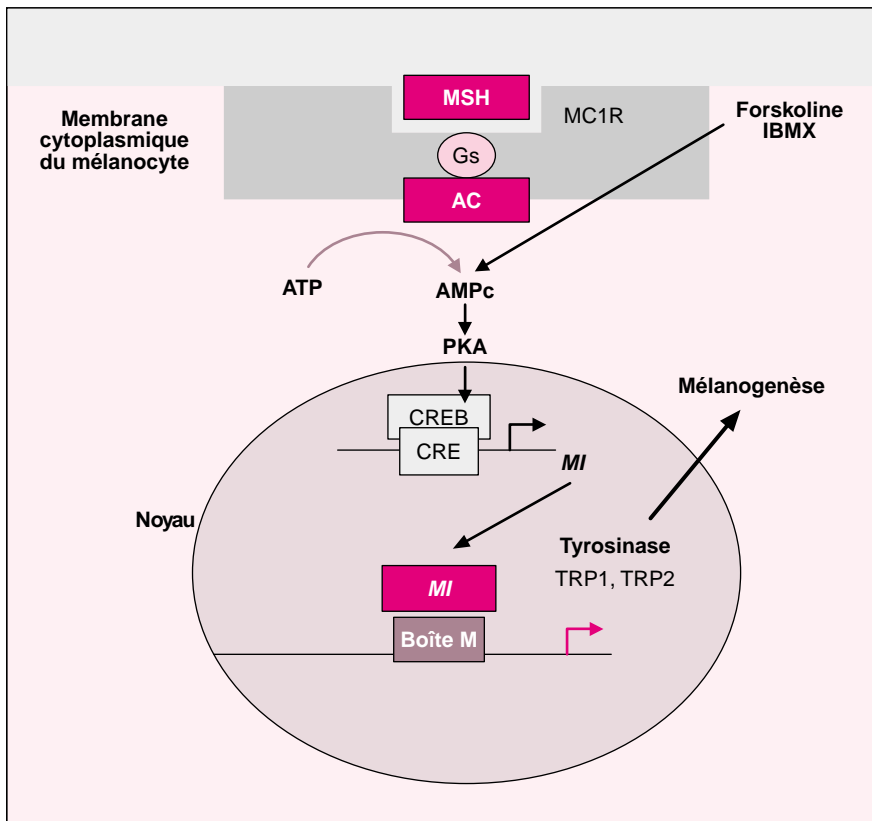


Figure 2. **Mécanismes moléculaires de la mélanogenèse induite par L'AMP cyclique.** L'AMP cyclique, via l'activation de la PKA et de CREB, stimule la transcription de *microphthalmia*. Ce facteur de transcription se fixe aux boîtes E et M des promoteurs des enzymes mélanogéniques, tyrosinase, TRP-1 et TRP-2, et stimule leur expression. L'augmentation de l'expression de ces enzymes entraîne une augmentation de la synthèse des pigments mélaniques. AC: adénylylcyclase; Mi: *microphthalmia*.

Ces observations montrent qu'il existe un réseau complexe de régulations qui contrôlent l'expression de *microphthalmia*, qui représente le facteur clé de la différenciation mélanocytaire. S'il est clairement démontré que PAX3, SOX10 et LEF-1 jouent un rôle déterminant dans l'embryogenèse mélanocytaire, leur rôle dans le contrôle de la mélanogenèse reste à définir.

L'AMP cyclique et les autres voies de la signalisation de la mélanogenèse

Phosphatidylinositol-3-kinase et p70S6 kinase

D'autres voies de transduction ont été impliquées dans la signalisation cellulaire de la mélanogenèse (figure 3). L'inhibition spécifique de la phos-

phatidylinositol-3-kinase (PI3-kinase), ainsi que celle de la p70S6 kinase, stimulent fortement la mélanogenèse et la dendritogenèse [30]. En outre, la forskoline, *via* une augmentation des taux intracellulaires en AMPc, inhibe partiellement la PI3-kinase et bloque complètement l'activité de la p70S6 kinase. Ces observations suggèrent (1) que l'inhibition de la PI3-kinase-p70S6 kinase est impliquée dans la régulation de la différenciation mélanocytaire et (2) que la mélanogenèse et la dendritogenèse, induites par l'AMPc, sont au moins en partie relayées par l'inhibition de la voie PI3-kinase/p70S6 kinase par l'AMPc.

La famille Rho des petites GTPases et le contrôle de la dendricité mélanocytaire

La croissance des dendrites est un événement très important, qui carac-

térise l'activation mélanocytaire, et représente un processus essentiel assurant le transfert des mélanosomes aux kératinocytes épidermiques. Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de la dendritogenèse n'ont pas fait l'objet d'études approfondies jusqu'à présent. L'étude des composants du cytosquelette au cours de la dendritogenèse induite par l'AMPc dans des cellules de mélanome B16, a montré que la dendricité était accompagnée par la désorganisation des fibres de stress d'actine, et par l'apparition d'une forme d'actine en pointillé [31]. Or, ces processus sont sous le contrôle des petites GTPases Rho et Rac. En utilisant des toxines bactériennes qui inhibent spécifiquement l'activité de ces petites GTPases ou en surexprimant des mutants dominants négatifs de la protéine Rho, Buscà *et al.* [31] ont démontré que l'inhibition de Rho mime la dendricité induite par l'AMPc. De plus, l'activation de Rho par la toxine bactérienne CNF ou la surexpression de mutants constitutivement actifs de Rac et de Rho bloquent la croissance des dendrites induite par l'AMPc. Ces résultats montrent que la dendricité mélanocytaire induite par l'AMPc nécessite l'inhibition de Rho et la désorganisation des fibres de stress.

L'AMPc active la voie des MAP-kinases dans les mélanocytes

Les MAP-kinases ERK1 et ERK2 sont des sérine-thréonine kinases phosphorylées et activées par la MAP-kinase kinase (MEK). MEK est elle-même activée par la Kinase Raf-1, activée à son tour par la petite GTPase p21Ras. Après leur activation, les ERK se relocalisent dans le noyau, dans lequel elles activent des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ou la prolifération selon le système cellulaire. Dans la plupart des types cellulaires, l'AMPc inhibe la voie de la MAPK. Néanmoins, dans les cellules de mélanome B16 et les mélanocytes humains normaux, l'augmentation de l'AMPc active les MAPK (ERK1, ERK2) [32, 33]. Dans les mélanocytes, l'activation de ERK par l'AMPc est due à l'activation de la petite GTPase p21Ras et de la kinase B-Raf,

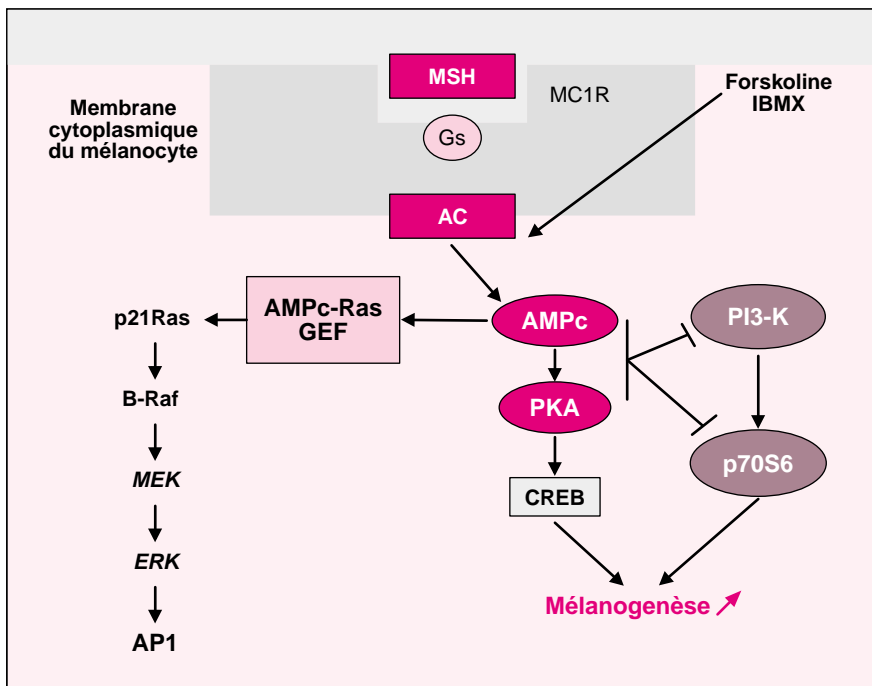


Figure 3. **Voies de signalisation impliquées dans la mélanogenèse.** D'autres voies de transduction ont été impliquées dans la signalisation cellulaire de la mélanogenèse. L'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc inhibe partiellement la PI3-kinase et bloque complètement l'activité de la p70S6 kinase. L'inhibition de ces kinases suffit pour stimuler la mélanogenèse. L'activation d'ERK par l'AMPc dans les mélanocytes est due à l'activation de la petite GTPase p21Ras et de la kinase B-Raf, une isoforme de Raf, fortement exprimée dans des cellules d'origine neurale. L'activation de Ras par l'AMPc est indépendante de la protéine-kinase A. Ces données suggèrent l'existence d'un facteur d'échange pour p21Ras (AMPC-Ras-GEF), activé directement par l'AMPc, et qui serait exprimé spécifiquement dans les cellules mélanocytaires. AC : adénylylcyclase ; ERK : extracellular signal regulated kinase ; MEK : mitogen activated ERK kinase.

une isoforme de Raf fortement exprimée dans les cellules d'origine neurale. L'activation de Ras par l'AMPc, qui n'a pas été mise en évidence dans un autre système cellulaire, ne dépend pas de la protéine-kinase A, et n'implique pas non plus SOS, le facteur d'échange classique de Ras [33]. Ces données suggèrent l'existence d'un facteur d'échange de p21Ras, activé directement par l'AMPc, et qui serait exprimé spécifiquement dans les cellules mélanocytaires. L'existence de telles voies de signalisation spécifiques des mélanocytes ouvrent de nouvelles perspectives de recherche sur la différenciation de ce type cellulaire.

Interaction entre les voies de l'AMPc et des protéine-kinases C

L'effet négatif d'un inhibiteur spécifique de la PKC sur la stimulation de l'activité de la tyrosinase induite par l'IBMX, suggère qu'il pourrait exister des interactions entre les voies de la PKC et de l'AMPc. Cependant, plusieurs travaux montrent que la mélanogenèse n'est pas modifiée, voire est stimulée par l'inhibition de la PKC, suggérant que cette voie n'est pas impliquée dans l'activation de la mélanogenèse [34]. L'implication de la voie de transduction de la protéine kinase C, et en particulier de l'isoforme β de la PKC, dans la

régulation de la mélanogenèse a été suggérée. En effet, des travaux récents ont montré que la PKC phosphoryle la tyrosinase et stimule son activité [35].

Rôles des MAP-kinases dans le développement et la différenciation des mélanocytes

Des études récentes ont mis en évidence la relation entre les MAP-kinases et le développement mélanocyttaire. Au cours du développement des mélanocytes, le facteur de croissance des cellules souches (*stem cell factor*, SCF) active son récepteur (*c-kit*) et entraîne l'activation des MAPK. L'effet du SCF est considéré comme un événement essentiel dans le processus de pigmentation, puisque des mutations de la lignée germinale au locus de *c-kit* ou du *steel factor* aboutissent à des défauts pigmentaires (pié-baldisme) [36].

Des résultats récents [37] ont récemment permis de mieux comprendre les mécanismes qui relient la cascade de la MAPK et le développement des mélanocytes. ERK2 phosphoryle la sérine 73 de *microphthalmia* et augmente son activité transcriptionnelle sur le promoteur de la tyrosinase, suggérant ainsi que la phosphorylation de *microphthalmia* par ERK pourrait jouer un rôle dans l'induction de la mélanogenèse [37]. L'activation de *microphthalmia* n'est pas due à des modifications de sa localisation nucléaire ni de sa capacité de liaison à l'ADN. La phosphorylation de *microphthalmia* contrôle l'association de ce facteur au co-activateur transcriptionnel p300/CBP [38].

Néanmoins, d'autres travaux ont montré que le traitement des cellules de mélanome B16 avec l'inhibiteur de la MEK, PD 98059, ou la surexpression d'un mutant dominant négatif de Ras ou de MEK induisent la mélanogenèse et une augmentation de l'expression de la tyrosinase. De la même façon, la surexpression des mutants constitutivement actifs de Ras et de MEK inhibent l'expression de la tyrosinase et la mélanogenèse [39]. Ces données montrent que l'activation de la voie des MAPK inhibe la mélanogenèse. Cette inhibition pourrait représenter un mécanisme de rétrocontrôle permet-

tant de limiter la surproduction de mélanines, toxique pour les mélanocytes.

Ces résultats semblent contredire les données décrites précédemment, selon lesquelles la phosphorylation de microphthalmia par ERK conduirait à l'augmentation de la mélanogénèse. Récemment, de nouvelles données ont été obtenues [40], expliquant les effets antimélanogéniques induits par l'activation de la voie de la MAPK.

En utilisant le système de double hybride dans la levure, le groupe de E. Medrano a pu montrer que l'*ubiquitine conjugating enzyme* humaine, hUBC9, interagit avec microphthalmia. En outre, les auteurs ont mis en évidence l'ubiquitination de microphthalmia, qui conduit à sa dégradation. Ce processus dépend de hUBC9 et de l'activité du protéasome. La phosphorylation de la sérine 73 de microphthalmia par ERK est essentielle pour son ubiquitinylation et sa dégradation [40]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de la MAPK inhibe la mélanogénèse, *via* l'augmentation de la dégradation de Microphthalmia celle-ci dépend de sa phosphorylation et de son ubiquitinylation, induite par la MAPK.

En résumé, bien que la phosphorylation de la sérine 73 de microphthalmia augmente l'activité transcriptionnelle intrinsèque de ce facteur, cette modification le dirige aussi vers le protéasome où il est dégradé. Par conséquent, la diminution de la quantité de la protéine microphthalmia conduit à la diminution de l'expression des enzymes mélanogéniques et à l'inhibition de la mélanogénèse.

Rôle de l' α -MSH et des récepteurs des hormones mélanotropes dans la mélanogénèse photo-induite

Les mécanismes moléculaires de la mélanogénèse photoinduite ne sont que très partiellement caractérisés. L'irradiation des mélanocytes humains normaux en culture par des rayons ultraviolets induit une stimulation de la mélanogénèse, par un effet direct. Cependant, l'intervention de

facteurs paracrines d'origine kératinocytaire dont la synthèse et/ou la sécrétion sont augmentées par l'exposition aux rayons ultraviolets est bien établie. Il s'agit soit de facteurs inhibant la mélanogénèse, tels que l'interleukine-1 α , le TNF α , les interférons, ou le bFGF, soit de facteurs stimulant la mélanogénèse tels que la prostaglandine PGE2, l'endothéline, le NO [41, 42], les dimères de pyrimidines [43]. Les rayons UV-B stimulent la production de CRH par les mélanocytes humains normaux [7], et induisent également la synthèse des ARNm du récepteur-1 du CRF [7]. Ces observations ont conduit à proposer l'hypothèse selon laquelle la réponse pigmentogène de la peau induite par les UV-B implique un équivalent cutané de l'axe hypothalamo-hypophysaire comprenant le CRH, le CRHR et le POMC.

L'exposition aux rayons UV stimule également la synthèse et la sécrétion d' α -MSH et de peptides mélanotropes, ainsi que celle des ARN messagers de la POMC, dans des lignées de kératinocytes humains. La stimulation par les rayons ultraviolets induit des réponses similaires dans les mélanocytes humains normaux et dans les cellules de mélanomes en culture [44].

Les rayons ultraviolets stimulent l'expression du MC1R sur des cellules de mélanome murin et augmentent la liaison de l' α -MSH à son récepteur sur les mélanocytes humains normaux en culture. Ces observations suggèrent que l'irradiation de la peau par les UV augmente la production locale de peptides mélanotropes dans l'épiderme ainsi que l'expression des récepteurs pour ces peptides stimulant ainsi la réponse mélanogénique des mélanocytes [6, 45].

Plusieurs arguments plaident pour le rôle indispensable de l'AMP cyclique dans la mélanogénèse induite par les rayons UV.

En l'absence d'agents pharmacologiques inducteurs de l'AMPc, les rayons UVB, en irradiation unique ou multiple, inhibent la mélanogénèse dans les mélanocytes humains normaux en culture, et diminuent l'expression et l'activité de la tyrosinase. A l'inverse, l'ajout d' α -MSH ou de dibutryl AMPc dans le milieu de

culture « restaure » la réponse mélanogénique des mélanocytes à la stimulation par les UVB, ainsi que l'augmentation de l'expression de la tyrosinase. Ces dernières observations suggèrent que la stimulation de la synthèse d'AMPc est indispensable pour la mélanogénèse photo-induite par les UVB dans les mélanocytes humains normaux en culture [46].

La concentration d' α MSH et d'ACTH dans la peau dépend non seulement de la synthèse de ces peptides, mais également de leur dégradation par des protéases locales. L' α -MSH peut se lier au MC1R. Cette enzyme, appelée également néprilysine, enképhalinase ou CD10, inactive également de nombreux autres peptides, en particulier l'endothéline-1. La NEP est très fortement exprimée dans les mélanocytes humains normaux et dans les cellules de mélanome. L'expression de cette enzyme, ainsi que son activité, sont inhibées par l'exposition aux rayonnements UV-B. *In vitro*, l'inhibition de la NEP augmente l'activité mélanogénique de l' α -MSH et de l'ACTH dans les mélanocytes humains normaux *via* une augmentation de l'activité tyrosinase et de l'expression de microphthalmie.

L'inhibition de la NEP est donc probablement l'un des mécanismes de la mélanogénèse photo-induite, provoquée par l'absence de dégradation des peptides mélanotropes α -MSH et ACTH, et peut-être également de l'endothéline-1 [47].

Conclusions

Le décryptage des voies de signalisation de la mélanogénèse induite par des agents pharmacologiques et physiques, comme les rayons ultraviolets, a permis d'identifier de nouvelles cibles qui devraient permettre, à court ou à moyen terme, d'enrichir l'arsenal thérapeutique permettant le traitement des troubles pigmentaires de la peau. En effet, en ce qui concerne le domaine des agents pigmentants et dépigmentants, la pharmacopée est actuellement très pauvre.

Compte tenu du rôle photoprotecteur de l'eumélanogénèse, une meilleure connaissance de ses mécanismes de régulation pourrait permettre de stimuler cette voie de

façon pharmacologique, sans recourir aux rayonnements ultraviolets, dont le rôle dans la carcinogenèse cutanée est bien démontré. Des stratégies de prévention de la photocarcinogenèse de la peau, efficaces et sans danger, pourraient ainsi être mises en place.

La caractérisation du récepteur MC1R a permis de comprendre son rôle dans le contrôle de l'eumélanogenèse et dans la détermination du phototype. Les phototypes humains directement corrélés au risque de photocarcinogenèse cutanée pourraient ainsi être définis sur des bases moléculaires correspondant à l'expression de différents variants du MC1R. Il serait alors possible de corréler les polymorphismes alléliques du gène *MC1R* aux risques de cancer cutané. L'élucidation de ces mécanismes pourrait ouvrir une nouvelle ère pour l'épidémiologie et la prévention de la cancérogenèse cutanée ■

* GLOSSAIRE *

ASP: Agouti signaling protein.
bFGF: basic fibroblast growth factor.
PGE2: prostaglandine E2.
NO: nitric oxide.
MAP-kinase: mitogen-activated protein kinase.
CRE: cyclic AMP responsive element.
CREB: cyclic AMP responsive element binding protein.
PKA: cAMP dependent protein kinase.
TRP1: tyrosinase related protein-1.
TRP2: tyrosinase related protein-2.
DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acide.
DHI: dihydroxyindole.
DOPA: dihydroxyphénylalanine.
α-MSH: α-mélanocyte stimulating hormone.
MC1R: melanocortin receptor type 1.
ACTH: adrenocorticotrop hormone.
NEP: neutral endopeptidase.
POMC: pro-opiomélanocortine.
CRH: corticotropin releasing hormone.
CRHR: corticotropin releasing hormone receptor.

RÉFÉRENCES

- Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest Dermatol* 1999; Suppl 4: 24-8.
- Vincenzi MR, d'Ischia M, Napolitano A, et al. Pheomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: a pilot study. *Melanoma Res* 1998; 8: 53-8.
- Barsh GS. Genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 1996; 12: 299-305.
- Furumura M, Sakai C, Potterf SB, Vieira WD, Barsh GS, Hearing VJ. Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7374-8.
- Gunn TM, Kimberly A, He L, et al. The mouse *mahogany* locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* 1999; 398: 152-3.
- Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans. *Pigment Cell Res* 1998; 11: 265-74.
- Slominski A, Ermak G, Mazurkiewicz JE, Baker J, Wortsman J. Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1020-4.
- Pears JS, Jung RT, Bartlett W, Browning MC, Kenicer K, Thody AJ. A case of skin hyperpigmentation due to α-MSH hypersecretion. *Br J Dermatol* 1992; 126: 286-9.
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; 11: 328-30.
- Valverde P, Healy E, Sikkink S, et al. The Asp84Glu variants of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 1994; 5: 1663-6.
- Kurde H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998; 19: 155-6.
- Hunt G. Melanocyte-stimulating hormone: A regulator of human melanocyte physiology. *Pathobiol* 1995; 63: 12-21.
- Bertolotto C, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R. Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol* 1996; 134: 747-55.
- Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, Ballotti R. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 694-702.
- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 1993; 74: 395-404.
- Carr C S, Sharp PA. A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E-box binding protein. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4384-8.
- 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: 827-35.
- Aberdam E, Bertolotto C, Sviderskaya EV, et al. Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 19560-5.
- Eisen T, Easty DJ, Benett DC, Goding CR. The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene* 1995; 11: 2157-64.
- Carreira S, Dexter TJ, Yavuzer U, Easty DJ, Goding CR. Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5099-108.
- Galibert MD, Yavuzer U, Dexter J, Goding CR. Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *J Biol Chem* 1999; 274: 26894-900.
- Verastegui C, Bertolotto C, Bille K, Abbe P, Ortonne JP, Ballotti R. TFE3 and TFEB as transcriptional activators of tyrosinase and TRP1 genes. *Mol Endocrinol* 1999; 14: 449-56.
- Udono T, Yasumoto K, Takeda K, et al. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1491: 205-19.
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE, et al. Waardenburg's syndrome patients have mutation in the human homologue of the *pax-3* paired box gene. *Nature* 1992; 355: 635-6.
- Watanabe A, Takeda K, Ploplis B, Tachibana M. Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet* 1998; 18: 283-6.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, et al. SOX 10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 1998; 18: 171-3.
- Potterf B, Furumura M, Dunn J, Arnheiter H, Pavan WJ. Regulation of MITF gene expression by SOX10. *Hum Genet* 2000; 107: 1-6.
- Dorsky MI, Raible DW, Moon RT. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev* 2000; 14: 158-62.

RÉFÉRENCES

29. Takeda K, Yasumoto Ki, Takada R, *et al.* Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem* 2001 (sous presse).
30. Buscà R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/p70^{S6}-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem* 1996; 271 : 31824-30.
31. Busca R, Bertolotto C, Abbe P, *et al.* Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol Biol Cell* 1998; 9 : 1367-78.
32. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clément M, Lallemand D, Ortonne JP, Ballotti R. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270 : 24315-20.
33. Busca R, Abbe P, Mantoux F, *et al.* Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal regulated kinases (ERKs) in melanocyte cells. *EMBO J* 2000; 19 : 2900-10.
34. Bertolotto C, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R. In B16 melanoma cells, the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter. *Oncogene* 1998; 16 : 1665-70.
35. Park HY, Perez JM, Laursen R, Hara M, Gilchrist BA. Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1999; 274 : 16470-8.
36. Fleischman RA, Saltman D, Stastny V, Zneimer S. Deletion of the c-kit proto-oncogene in human developmental defect piebald trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 : 10885-9.
37. Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAPK links microphthalmia to c-kit signaling in melanocytes. *Nature* 1998; 391 : 298-301.
38. Price ER, Ding HF, Badalian T, *et al.* D. lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J Biol Chem* 1998; 273 : 17983-6.
39. Englaro W, Bertolotto C, Busca R, *et al.* Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cells differentiation. *J Biol Chem* 1998; 273 : 1-5.
40. Xu W, Gong L, Haddad MM, *et al.* Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the human ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 2000; 255 : 135-43.
41. Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxid and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 1996; 271 : 28052-6.
42. Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99 : 1-8.
43. Gilchrist BA, Park HY, Eller MS, Yaar M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 1996; 93 : 1-10.
44. Chakraborty A, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek J. Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995; 105 : 655-9.
45. Pawelek JM, Chakraborty AK, Osber MP, *et al.* Molecular cascades in UV-induced melanogenesis: a central role for melanotropins? *Pig Cell Res* 1992; 5 : 348-56.
46. Im S, Moro O, Peng F, *et al.* Activation of the cyclic AMP pathway by α -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res* 1998; 58 : 47-54.
47. Aberdam E, Mari B, Auberger P, Ortonne JP, Ballotti R. UVB control of melanogenesis via regulation of neutral endopeptidase (NEP), the enzyme responsible for the degradation of alpha-MSH. *J Invest Dermatol* 2000; 115 : 381-7.

ICGM

CLUB 2001

Génétique expérimentale
et Développement

Mardi 6 février
13 heures 30

Frédéric Jaisser, U. 478
INSERM, Bichat, Paris
Expression inducible
chez la souris
grâce au système Tet

Mardi 6 mars
13 heures 30

Thierry Forne, UMR5535,
IGMM, Montpellier
ARN H19 et régulation
de l'empreinte parentale
au locus *Igf2-H19*

Salle de conférences 6^e étage
Bâtiment Faculté
24, rue du Faubourg-Saint-Jacques,
75014 Paris, France.

Summary

Cyclic AMP is a key messenger in the regulation of skin pigmentation

The signalling pathways involved in melanogenesis have been partially elucidated. The role of melanotropin peptides, α -MSH and ACTH, in melanocyte differentiation and in the regulation of melanogenesis is now widely recognized. Their melanogenic effects appear to be mediated through the up-regulation of the cAMP pathway by the melanocortin-1 receptor and the activation of adenylyl cyclase. The molecular mechanisms involve the subsequent phosphorylation and activation of PKA, followed by CREB which binds to the promoter of the transcription factor Microphthalmia, and upregulates its transcription. The elevated expression of Microphthalmia increases its binding to the specific E-box and M-box present in the tyrosinase promoter, resulting in an increased expression of this enzyme and the up-regulation of melanin synthesis. LEF-1 and β -catenin also regulate the expression of Microphthalmia and play a key-role in pigment cell differentiation. Other transcription factors such as Brn2, TBX2, PAX3, Sox10 are also involved in these processes. cAMP modulates several other signalling pathways involved in the regulation of melanogenesis. The cAMP-induced melanogenesis and dendricity are partially mediated by the inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase/p70S6 kinase pathway. In addition, cAMP activates a melanocyte-specific pathway leading to MAP kinase activation. These new advances lead to a better understanding of the natural photoprotective mechanisms of the skin. In the future, they should help to the development of treatments for pigimentary disorders, and more efficient prevention strategies against sun-induced carcinogenesis of human skin.