

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DU FACTEUR NR2F1 DANS LE DÉFAUT DE DÉVELOPPEMENT DES
MÉLANOCYTES CHEZ LA SOURIS *SPOT*, UN MODÈLE MURIN POUR LE
SYNDROME DE WAARDENBURG DE TYPE IV

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
GREGOIRE BONNAMOUR

AOÛT 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Nicolas Pilon, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et fait suffisamment confiance pour me donner l'opportunité de travailler sur un sujet original. Durant toute la durée de ma thèse, ses conseils et son soutien m'ont été précieux pour progresser dans mon cheminement scientifique. C'est aussi grâce à lui que j'ai eu la chance de participer à de très bons congrès scientifiques et publier mes résultats dans des revues scientifiques intéressantes.

Je remercie les membres de mon jury, les professeurs François Berthod, Catherine Mounier et Benoit Barbeau.

Je remercie aussi la Professeure Sarah Jenna, grâce à qui j'ai fait mes premiers pas au Québec et à l'UQAM comme étudiant au doctorat.

Je remercie chaleureusement la Professeure Claire Bénard pour ses conseils avisés et son immense aide. Elle m'a permis de retomber sur mes pattes après un début de thèse difficile, et m'a épaulé durant toute la suite de cette aventure. Le fait d'avoir su pouvoir compter sur son soutien m'a permis de voir l'avenir de manière plus apaisée.

Je tiens à remercier le Dr Emmanuel Martin, qui a été mon guide dans ma première partie de doctorat au contact des vers, et qui a accepté que je sois son co-premier auteur, ainsi que Benjamin et Barbara qui ont été mes collègues durant ces quelques mois dans l'univers des nématodes.

Je remercie bien évidemment tous les membres actuel·le·s et passé·e·s du laboratoire Pilon, à commencer par Ouliana Souchkova, dont la bienveillance et la disponibilité en font un des piliers de cette équipe. Les fruits de son jardin, gâteaux et bonbons qu'elle a régulièrement apportés au laboratoire ont donné une saveur particulière à certaines de nos journées ! Bien entendu, je remercie chaleureusement la Dre Tatiana Cardinal, qui a eu la lourde charge de me supporter comme voisin de pailleuse durant toutes ces

années. Sa patience et sa connaissance de tout ce qui se fait au laboratoire en font la cible parfaite pour toutes les questions des étudiants. Je tiens aussi à particulièrement remercier le Dr Rodolphe Soret pour son soutien moral et scientifique, les cafés, et pour m'avoir aidé à débloquer des situations qui me paraissaient inextricables. Je remercie également Baptiste Charrier, dit le scribe, mon compère Spot/Nr2f1, avec qui j'ai pu échanger idées scientifiques et souris. Grâce à lui, il ne fait aucun doute que la suite de l'histoire NR2F1 sera passionnante, à condition qu'il ne perde pas sa carte étudiante ! Je remercie également Sephora Salis, Elizabeth Leduc, Benoit Grondin, Nejia Lassoued, Marie Lefèvre, Sherin Nawaito, Sanaa Tork, Alassane Gary, Mohammad Omrani, Mostafa Esmael, Félix-Antoine Bérubé-Simard, Aboubacrine M. Touré, Guillaume Bernas et Karl Bergeron, pour leur aide, soutien, gentillesse. Ce doctorat n'aurait pas eu la même saveur sans eux. Je leur souhaite à toutes et tous beaucoup de joie et de réussite dans leurs projets.

Je remercie bien évidemment les employés de l'UQAM et du CERMO-FC, à commencer par Hermance Beaud pour sa gentillesse et son aide, et tout le personnel de l'animalerie, qui a su faire preuve de gentillesse et de patience lorsque je laissais un peu trop longtemps mes souris sans surveillance. Je remercie aussi le personnel administratif, et plus spécialement les employés et employées du secrétariat. J'adresse aussi des remerciements particuliers à Denis Flipo à qui je dois la totalité de mes connaissances en microscopie et en cytométrie, et qui m'a fait confiance pour lui donner un coup de main à la plateforme et l'accompagner lors de balades à vélo ! L'UQAM a une chance immense de l'avoir pour faire vivre la recherche scientifique. Pour leur gentillesse et leur disponibilité, je remercie les professeures et professeurs de l'étage et du département, François Ouellet, Said Kourrich, Benoit Vanderperre, Malika Oubaha, François Dragon, Marc Lussier.

Je remercie la communauté cycliste pour son soutien, et plus particulièrement l'atelier BQAM-E, les amies et amis du comité mob' Gabriel, Simon, René, Gabrielle, Julien, Besse et Egor, ainsi que mes collègues membres du CA.

Je remercie Sylvie et Michel pour la gentillesse de leur accueil lors de nos retours en France.

J'ai une pensée toute particulière pour Louissette et Hubert, mes deux grands-parents décédés pendant mon doctorat, et à qui je n'ai pas pu dire adieu. Cette thèse porte, en elle, un petit bout d'eux. Je remercie ma grand-mère Claude pour sa gentillesse et sa bonté. Malgré la distance, je suis heureux d'avoir pu partager un peu de ma vie canadienne avec elle. Je remercie bien évidemment mes frères et sœurs, et leur conjointe et conjoint, Charlotte, Paul et Mathilde, Clotilde et Charles. Bien qu'un océan nous sépare, je suis chanceux d'avoir pu compter sur votre soutien. Je remercie mes parents, Gilles et Marie-Élisabeth, de m'avoir soutenu dans mon expatriation et dans ce choix insensé de faire une thèse à l'autre bout du monde. Merci d'avoir accepté de subir les 7h de voyage pour découvrir ma vie ici, je suis heureux de pouvoir quotidiennement échanger avec vous.

Enfin, ce doctorat n'aurait tout simplement pas été possible sans le soutien de Lise, ma conjointe, qui après avoir accepté de me suivre dans le grand froid canadien, m'a soutenu dans mon choix de changer de laboratoire, et a supporté de vivre pendant 6 années avec un vieil étudiant. Merci de m'avoir encouragé et épaulé durant toutes ces années si difficiles, merci de me suivre dans mes nouvelles lubies de cycliste et d'urbanisme, merci de m'avoir sorti la tête de l'eau lorsque mon moral vacillait. Je me sais chanceux de t'avoir à mes côtés, et je suis heureux d'avoir pu construire cette histoire avec toi malgré les obstacles. Tu me combles de bonheur, merci !

Chacun cherche sa route ; nous cherchons
la nôtre et nous pensons que le jour où le
règne de la liberté et de l'égalité sera
arrivé, le genre humain sera heureux.

AVANTS-PROPOS

Cette thèse est le fruit de six années de recherche. Elle a porté sur deux sujets extrêmement éloignés. Le choix a été fait de ne traiter qu'un seul de ces deux sujets dans ce manuscrit.

En effet, ce doctorat a commencé par l'étude du rôle des voies métaboliques dans le contrôle de l'élongation de l'embryon chez *C. elegans*, et plus particulièrement de leur lien avec les voies de signalisation des Rho GTPases. Cette première étude a donné lieu à un article en co-premier auteur (APPENDICE A), qui démontre que la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) et les gènes contrôlant l'autophagie sont nécessaires à l'élongation des cellules épidermiques suivant le programme RhoA-like mais ne concerne pas les autres cellules. Cela a donné un éclairage sur l'utilisation de l'autophagie l'AMPK-dépendante par l'embryon pour alimenter les processus morphogéniques d'élongation précoces les plus exigeants en énergie.

À la suite d'une réorientation après une année et demie, un nouveau sujet a été attribué à cette thèse, c'est ce dernier qui sera abordé dans ce manuscrit.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	i
AVANTS-PROPOS	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
RÉSUMÉ	xiv
ABSTRACT.....	xvi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Le rôle des mélanocytes.....	3
1.1.1 Brefs rappels historiques.....	3
1.1.2 Les mélanocytes de la peau et des poils.....	6
1.1.3 Les mélanocytes de l'oreille interne.	14
1.1.4 Les mélanocytes du reste du corps.....	21
1.2 Le développement des mélanocytes.....	22
1.2.1 La crête neurale.....	22
1.2.2 La voie de migration dorsolatérale.....	31
1.2.3 La voie de migration ventrale.	33
1.2.4 Processus moléculaire impliqués dans le développement des mélanocytes.	44
1.2.5 La formation des follicules.....	46
1.3 Les neurocristopathies	48
1.3.1 La maladie de Hirschsprung.....	48
1.3.2 Le syndrome de Waardenburg.....	50
1.3.3 Le modèle de souris <i>Spot</i>	52
1.3.4 Rôle du facteur NR2F1 dans le syndrome de Waardenburg de type IV.	58
1.4 Hypothèses et objectifs.	60

CHAPITRE II	DHH-EXPRESSING SCHWANN CELL PRECURSORS CONTRIBUTE TO SKIN AND COCHLEAR MELANOCYTES, BUT NOT TO VESTIBULAR MELANOCYTES	61
2.1	Résumé.....	61
2.2	Abstract.....	62
2.3	Significance :	62
2.4	Figures.....	72
CHAPITRE III	NR2F1 REGULATES A SCHWANN CELL PRECURSOR-VS- MELANOCYTE CELL FATE SWITCH IN A MOUSE MODEL OF WAARDENBURG SYNDROME TYPE IV	78
3.1	Résumé.....	78
3.2	Abstract.....	79
3.3	Results.....	83
3.3.1	Hair follicles of Nr2f1Spt/Spt mice are devoid of melanocytes..	83
3.3.2	NR2F1 overexpression in Nr2f1Spt/Spt mice leads to abnormal differentiation of NCC-derived skin melanoblasts into SCP-like cells.	86
3.3.3	NR2F1 overexpression in Nr2f1Spt/Spt mice prevents the normal differentiation of SCPs into skin melanocytes.....	87
3.3.4	The Spot mutation differentially impacts the cōlonization of NCC- derived and SCP-derived melanocytes in the inner ear.	87
3.4	Discussion.....	88
3.4.1	Dysregulation of SCP-vs-melanocyte cell fate switch is likely a common gene defect-independent theme in WS	89
3.4.2	Are KIT-positive cells at the very bottom of hair follicles really melanocytes?.....	91
3.5	Materials and methods	92
3.5.1	Animals	92
3.5.2	Preparation and analysis of embryonic and postube neuralatal tissues via immunofluorescence.....	93
3.5.3	EdU pulse-chase assay.	94
3.5.4	Statistics.	94
3.6	FIGURES	96
CHAPITRE IV	DISCUSSION	110

4.1	Les deux voies de migration des mélanocytes	111
4.1.1	Les mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann DHH+. 111	111
4.1.2	Homogénéité dans la répartition des mélanocytes de la peau dérivés des PCS 115	115
4.1.3	L'importante proportion des mélanocytes dérivés des PCS.	115
4.1.4	La répartition spatiale des mélanocytes de l'oreille interne.....	117
4.1.5	Implication des mélanocytes dans la réparation de la peau.	118
4.2	Le développement des mélanocytes dans le syndrome de Waardenburg de type IV.	121
4.2.1	La voie de migration dérivée des cellules de la crête neurale.....	122
4.2.2	La voie de migration des précurseurs de cellule de Schwann.....	123
4.3	Le facteur NR2F1 et son rôle dans la différenciation des cellules de Schwann	124
4.4	La nouvelle population cellulaire du follicule.	126
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	128
	ANNEXE A RESULTATS PRELIMINAIRE DE SEQUENÇAGE ARNM SUR CELLULES UNIQUES DE FOLLICULES PILEUX.....	130
	APPENDICE A AMPK AND AUTOPHAGY CONTROL EMBRYONIC ELONGATION AS PART OF A RHOA-LIKE MORPHOGENIC PROGRAM IN NEMATODE	131
	APPENDICE B COUVERTURE DE PIGMENT CELL & MELANOMA RESEARCH VOLUME 34, ISSUE 3.....	132
	APPENDICE C GENETIC BACKGROUND INFLUENCES SEVERITY OF CÔLONIC AGANGLIONOSIS AND RESPONSE TO GDNF ENEMAS IN THE HOLSTEIN MOUSE MODEL OF HIRSCHSPRUNG DISEASE	133
	APPENDICE 4 PARTICIPATION A DES CONGRES SCIENTIFIQUES	134
	BIBLIOGRAPHIE	137

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1. La voie de synthèse de la mélanine.....	5
1.2. Schéma de la structure de l'épiderme.....	7
1.3. Contrôle de la voie de synthèse de la mélanine.....	9
1.4. Schéma de la structure du follicule pileux.....	12
1.5. Schéma de la différenciation des précurseurs de mélanocytes KIT+ en mélanocytes mature.....	13
1.6. Schéma d'une coupe transversale de cochlée.....	15
1.7. Schéma des différentes structures du vestibule.....	18
1.8. Schéma du fonctionnement des canaux ioniques de la cochlée.....	19
1.9. Schéma du processus de formation de la crête neurale.....	24
1.10. Vu d'ensemble des voies de régulations géniques impliquées dans la différenciation des cellules de la crête neurale.....	26
1.11. Schéma des sous-populations cellulaires de la crête neurale.....	27
1.12. Schéma des deux voies de migrations des cellules de la crête neurale.....	30
1.13. Stades de différenciation des cellules de la crête neurale en mélanocytes.....	33
1.14. La lignée des cellules de Schwann.....	35

1.15. Des mélanocytes dérivent de précurseurs de cellule de Schwann ayant exprimé <i>Plp1</i>	37
1.16. Origine des mélanocytes de l'oreille interne, du cœur, du cerveau et de la peau.	39
1.17. Le traçage des mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann	40
1.18. Migration crâniale des mélanocytes	42
1.19. Colonisation de la vésicule otique par les mélanocytes.....	43
1.20. Crible génétique pour la génération de modèle murin de neurocristopathie.....	53
1.21. Pigmentation des mutants Spot.....	55
1.22. Défaut au niveau de l'oreille interne des souris Spot.....	56
1.23. Mégacôlon aganglionnaire chez la souris Spot.....	57
2.1. Postube neuralatal distribution of melanocytes derived from <i>Dhh</i> -expressing SCPs in the skin	72
2.2. Prenatal distribution of melanoblasts derived from <i>Dhh</i> -expressing SCPs at e13.5.....	74
2.3. Postube neuralatal distribution of melanocytes derived from <i>Dhh</i> - and <i>Plp1</i> -expressing SCPs in the inner ear	76
3.1. Fur pigmentation defects in the Spot mouse line	92
3.2. Abnormal differentiation of NCC-derived melanoblasts in e12.5 <i>Nr2f1</i> ^{Spt/Spt} embryos	94

3.3. Abnormal differentiation of NCC-derived melanoblasts in e15.5 $Nr2f1^{Spt/Spt}$ embryos	96
3.4. Impaired differentiation of SCP-derived melanoblasts in e12.5 $Nr2f1^{Spt/Spt}$ embryos	97
3.5. SCP-derived cochlear melanocytes but not NCC-derived vestibular melanocytes are present in $Nr2f1^{Spt/Spt}$ mice	99
3.6. Cranial SCP-derived melanoblasts are not impacted by the <i>Spot</i> mutation.....	101
3.7. NR2F1 is not overexpressed in $Nr2f1^{Spt/Spt}$ cranial nerves	103

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BBSOA : *Bosch-Boonstra-Schaaf optic atrophy* = atrophie optique de Bosch-Boonstra-Schaaf

CCN : Cellules de la crête neurale

CN : Crête neurale

CS : Cellules de Schwann

CSM : cellules souches des mélanocytes

DHH : Desert hedgehog

DCT : Dopachrome tautomérase

EDNRB : Recepteur à l'endotheline de type B

EDN3 : Endotheline 3

FVB : Friend leukemia virus B

MITF : Facteur de Transcription Associé à la Microphthalmie.

MSC : *Melanocyte Stem Cell*

NR2F1 : le membre 1 de la sous famille 2 des récepteurs nucléaires = *Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1*

PCS : Précurseur de cellule de Schwann

PLP1 : protéine protéolipidique 1

SCP : *Schwann Cell Precursor*

SNE : Système nerveux entérique

SOX10 : *SRY-Box Transcription Factor 10*

TN : Tube neural

UV : Ultraviolet

WT : « wild type », souche sauvage

YFP : *Yellow Fluorescent Protein* = Protéine fluorescente jaune

RÉSUMÉ

Le syndrome de Waardenburg est une neurocristopathie qui se caractérise par des défauts de fonctionnement des mélanocytes, provoquant à la fois une dépigmentation et un dysfonctionnement de l'oreille interne. Dans de rares cas (1/1 000 000), cette maladie peut être associée à un mégacôlon aganglionnaire ou maladie de Hirschsprung, et prend alors le nom de Syndrome de Waardenburg de type IV.

La souris *Spot* a été générée par mutagenèse insertionnelle aléatoire, qui a eu pour effet de perturber le développement des cellules de la crête neurale. Ces cellules sont à l'origine d'une grande variété de types cellulaires, y compris les cellules gliales et les mélanocytes, des cellules pigmentées. À l'état homozygote, la souris *Spot* présente des défauts de pigmentation de la peau, des troubles de l'équilibre ainsi qu'un mégacôlon aganglionnaire, ce qui fait d'elle un bon modèle pour le Syndrome de Waardenburg de type IV.

Chez les mutants *Spot*, il a été montré que la dérégulation à la hausse de l'expression du facteur NR2F1 provoque une différenciation précoce des cellules de la crête neurale entériques en cellules gliales. Ces dernières sont incapables de coloniser le côlon, ce qui perturbe le développement du système nerveux entérique et provoque un mégacôlon aganglionnaire.

Cette thèse a pour but de caractériser le défaut de développement des mélanocytes dans le modèle de souris *Spot*, atteint du Syndrome de Waardenburg de type IV. Elle débute par la validation d'un modèle murin pour le traçage de l'origine des mélanocytes. Ainsi, nous avons tout d'abord mis en évidence que dans la peau, une majorité de mélanocytes dérivent de précurseurs de cellules de Schwann ayant exprimé la protéine Desert HedgeHog, et que les mélanocytes directement dérivés des cellules de la crête neurale y sont minoritaires. Au niveau de l'oreille interne, nous avons montré que la cochlée et le vestibule sont alimentés en mélanocytes par deux voies de migration distinctes, respectivement dérivés des précurseurs de cellules de Schwann ou directement des cellules de la crête neurale.

Chez les souris *Spot*, nous avons montré que la migration des mélanocytes du tronc est perturbée par l'expression importante du facteur NR2F1. Cela entraîne à la fois la différenciation des mélanocytes dérivés des cellules de la crête neurale en précurseurs de cellule de Schwann, et l'impossibilité des précurseurs de cellules de Schwann à se

différencier en mélanocytes. Au niveau du crâne, il est intéressant de noter que seuls les mélanocytes dérivés directement des cellules de la crête neurale et destinés à coloniser le vestibule sont atteints, alors que la cochlée est, elle, bien alimentée en mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann. Cela concorde avec l'absence de trouble de l'audition chez les souris *Spot*, mais la présence de défaut d'équilibre.

Pris ensembles, ces résultats apportent un éclairage sur les deux voies de migration des mélanocytes, à la fois pour ce qui concerne la colonisation de la peau, mais aussi de l'oreille interne. De plus, ils permettent de comprendre les mécanismes mis en œuvre dans le syndrome de Waardenburg de type IV, et plus particulièrement le rôle central du facteur NR2F1 dans la différenciation des mélanocytes en cellules de Schwann. Complétée par d'autres études, cette thèse pourrait ouvrir la voie à la compréhension d'autres maladies, ainsi qu'au développement de solutions thérapeutiques.

Mots clés : crête neurale, cellules de Schwann, neurocristopathie, mélanocytes, oreille interne

ABSTRACT

Waardenburg syndrome is a neurocristopathy characterized by defects of melanocyte function, causing both depigmentation and inner ear dysfunction. In rare cases (1/1,000,000), this disease can be associated with aganglionic megacolon or Hirschsprung disease and is then called Waardenburg Syndrome type IV.

The *Spot* mouse was generated by random insertional mutagenesis, causing disruptions of neural crest cell development. These cells give rise to a wide variety of cell types, including glial cells and melanocytes. At homozygous state, *Spot* mice have skin pigmentation defects, balance disorders and an aganglionic megacolon, making them a great model for Waardenburg Syndrome type IV.

In *Spot* mutants, it has been shown that upregulation of NR2F1 expression causes early differentiation of enteric neural crest cells into glial cells. Those cells are unable to colonize the colon, thereby disrupts the development of the enteric nervous system and causing aganglionic megacolon.

In this thesis, we characterize the defect in melanocyte development in the *Spot* mouse model of Waardenburg syndrome type IV. We first demonstrated that in the skin, a majority of melanocytes are derived from Schwann cell precursors expressing the Desert HedgeHog protein, and only a few melanocytes directly derive from neural crest cells. In the inner ear, we have shown that the cochlea and the vestibule are supplied by two distinct migration pathways, respectively melanocytes derived from Schwann cell precursors and those derived directly from neural crest cells.

In *Spot* mice, we have shown that the migration of trunk melanocytes is disrupted by the high expression of the NR2F1 factor. This results in both the differentiation of neural crest cell-derived melanocytes into Schwann cells and the inability of Schwann cell precursors to differentiate into melanocytes. In the skull, it is interesting to note that only neural crest cell-derived melanocytes supposed to colonize the vestibule are affected, whereas Schwann cell precursor-derived melanocytes do colonize the cochlea. This is consistent with the absence of hearing impairment in *Spot* mice, but the presence of balance impairment.

Taken together, these results shed light on the two pathways of melanocyte migration, both for skin colonization and for the inner ear. Furthermore, they provide insight into

the mechanisms involved in Waardenburg syndrome type IV, and more particularly the central role of NR2F1 in the differentiation of melanocytes into Schwann cells. Complemented by other studies, this thesis could pave the way to the understanding of other diseases, as well as to the development of therapeutic solutions.

Key words: neural crest, Schwann cells, neurocristopathy, melanocytes, inner ear

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les mélanocytes sont surtout connus pour être les cellules pigmentées de la peau et des poils mais, de manière originale, on les trouve aussi au niveau de l'oreille interne ainsi que dans d'autres organes. Ils dérivent des cellules de crête neurale (CCN) par deux voies de migration, dont la seconde, qui passe par un stade de précurseurs de cellules de Schwann (PCS), n'a été découverte que récemment. Depuis la mise en évidence de l'existence de cette voie par l'utilisation d'un modèle murin *Cre-LoxP*, aucune autre lignée comparable n'avait permis de confirmer ce résultat, ouvrant ainsi une discussion sur l'existence réelle ou non de ce processus. Par ailleurs, alors que les mécanismes de migration et de prolifération des mélanocytes de la peau sont étudiés depuis longtemps, le développement des mélanocytes de l'oreille interne n'avait jusqu'à récemment pas été un sujet de recherche très en vue, ni les potentiels défauts qui pourraient survenir durant ce processus. En effet, il arrive parfois que le développement des mélanocytes de la peau, mais aussi de l'oreille interne, soit perturbé par des maladies telles que les neurocristopathies, qui touchent précisément le développement des cellules de la crête neurale.

Le syndrome de Waardenburg de type IV, aussi appelée Syndrome de Waardenburg Shah, est une neurocristopathie qui touche moins de 1/1 000 000 naissances. Elle associe maladie de Hirschsprung et syndrome de Waardenburg. Elle se caractérise donc à la fois par un défaut de colonisation du côlon par les cellules de la crête neurale, qui entraîne une aganglionose, et par un défaut de développement de certaines cellules dérivées des cellules de la crête neurale, dont les mélanocytes. Cela peut mener à des malformations, des défauts de pigmentations des yeux, de la peau et des poils, ainsi qu'à un dysfonctionnement de l'oreille interne. Étant donnée

sa faible prévalence, le syndrome de Waardenburg de type IV n'a pas été beaucoup étudié et il n'existe que peu de modèles murins pour cette maladie. Ainsi, les mécanismes par lesquels le développement des mélanocytes est perturbé ne sont actuellement que peu connus, évidemment pour ce qui concerne la peau, mais encore d'avantage pour l'oreille interne.

Cette thèse porte donc sur l'étude des voies de migration des mélanocytes qui alimentent la peau et l'oreille interne, ainsi que sur la caractérisation des défauts de développement des mélanocytes dans le syndrome de Waardenburg de type IV.

Cette première partie est une revue des connaissances actuelles sur les mélanocytes, leurs rôles et leur développement, ainsi que sur le Syndrome de Waardenburg.

La seconde partie est une étude publiée traitant du développement des mélanocytes en utilisant un nouveau modèle de souris *Cre-loxP*. Cet article vient confirmer l'existence d'une voie de migration passant par des PCS, et montre pour la première fois qu'il existe une différence d'origine entre les mélanocytes du vestibule et de la cochlée. Il a fait la couverture du magazine *Pigment Cell and Melanoma Research* en octobre 2020 (APPENDICE 2).

La troisième partie est une étude acceptée pour publication dans *Pigment Cell and Melanoma Research*. Elle fait suite à un premier article publié en 2017 décrivant un nouveau modèle murin pour le syndrome de Waardenburg de type IV, et apporte un éclairage sur le défaut de développement des mélanocytes dans cette maladie. Elle a permis de mettre en évidence un mécanisme de différenciation cellulaire en faveur de la voie de différenciation des PCS au détriment des mélanocytes, que ce soit au niveau de la peau ou de l'oreille interne.

Enfin, la dernière partie est une discussion générale sur les différentes découvertes générées par cette étude et les éventuelles hypothèses qui en découlent, et qui pourraient servir à de futurs projets de recherche.

1.1 Le rôle des mélanocytes.

1.1.1 Brefs rappels historiques.

Les mélanocytes sont surtout connus comme étant des cellules productrices de mélanine. Ils sont très largement présents dans le règne animal, des insectes (Sugumaran et Barek, 2016), aux poissons (Allen *et al.*, 2019) et jusqu'aux mammifères (Victorelli *et al.*, 2019). Pour la majorité d'entre nous, la manifestation la plus visible du rôle des mélanocytes est la coloration de la peau. On peut donc imaginer que la manifestation de cette fonction a été observable bien avant notre apparition, depuis que couleur de pelage et d'écailles représentent une information importante et visible.

Si les premiers témoignages concernant des variations de couleur de peau chez l'humain, due à une maladie ou à des origines géographiques particulières, remontent à plus de 4000 ans (Westerhof, 2006), ce n'est qu'en 1819, après l'apparition de nouveaux outils d'observation, que Giosue Sangiovanni (Falabella, 2009) observe pour la première fois des cellules pigmentées. Le terme mélanocyte (du grec μέλας, mêlas/noir et κύτος, un contenant) est quant à lui utilisé pour la première fois en 1889 par Ernst Kromayer. Ces cellules sont alors caractérisées par leur couleur noire, sans que soit comprise l'origine de cette dernière.

C'est en 1895 que la tyrosinase, une des enzymes majeures de la voie de synthèse de la mélanine, est découverte par Bertrand et Bourquelot, qui met en évidence son rôle dans l'apparition de la coloration d'un champignon (Fitzpatrick et Lerner, 1954). Les premières ébauches de voie de synthèse de la mélanine apparaissent ensuite à partir de 1928 (Chang, 2009).

C'est aussi à la fin du XIX^{ème}, début du XX^{ème} siècle qu'apparaissent les premières hypothèses sur l'origine des mélanocytes, dont on pense alors qu'elle

serait épidermique. Mais en 1947, Mary E. Rawles publie son article intitulé «Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo » dans lequel elle met en évidence, grâce à des expériences de transplantation à partir d'une lignée murine pigmentée vers une lignée blanche, l'origine crête neurale des mélanocytes (Rawles, 1947). Cette découverte pose les bases de nombreuses autres études sur le développement des mélanocytes et plus largement sur celui des cellules de la crête neurale. Elle permettra à des chercheurs et chercheuses telles que Nicole Le Douarin d'apporter de nombreux éclairages sur ces deux phénomènes (Baroffio *et al.*, 1988; Dupin *et al.*, 1990; Lahav *et al.*, 1998; Lahav *et al.*, 1996; Le Douarin, 1975; Nataf *et al.*, 1993).

Les années 1960 voient naître énormément de découvertes concernant la mélanine. Tout d'abord, c'est dans ces années que la plupart des composés intermédiaires et des enzymes impliqués dans la voie de synthèse du pigment sont mis au jour (Niu et Aisa, 2017; Pillaiyar *et al.*, 2017; Westerhof, 2006) (Figure 1.1). C'est aussi à ce moment que sont découverts les deux types de mélanine, l'eumélanine, plus foncée, et la phéomélanine, plus claire, dont la proportion respective était à l'origine des différentes couleurs de cheveux et de poils (Brumbaugh, 1968) (Figure 1.1). Dans les mêmes années, une expérience de centrifugation par gradient de densité démontre l'existence d'organelles lipidiques gorgées de mélanines et contenant les enzymes nécessaires à sa synthèse (Marks et Seabra, 2001; Seiji et Fitzpatrick, 1961), ce sont les mélanosomes (Seiji *et al.*, 1961).

Ainsi l'on pourrait dire que l'étude des mélanocytes existe depuis que l'œil est capable de distinguer la couleur. Au niveau de la peau, cette fonction colorante est finement régulée, et dans d'autres organes, elle peut varier.

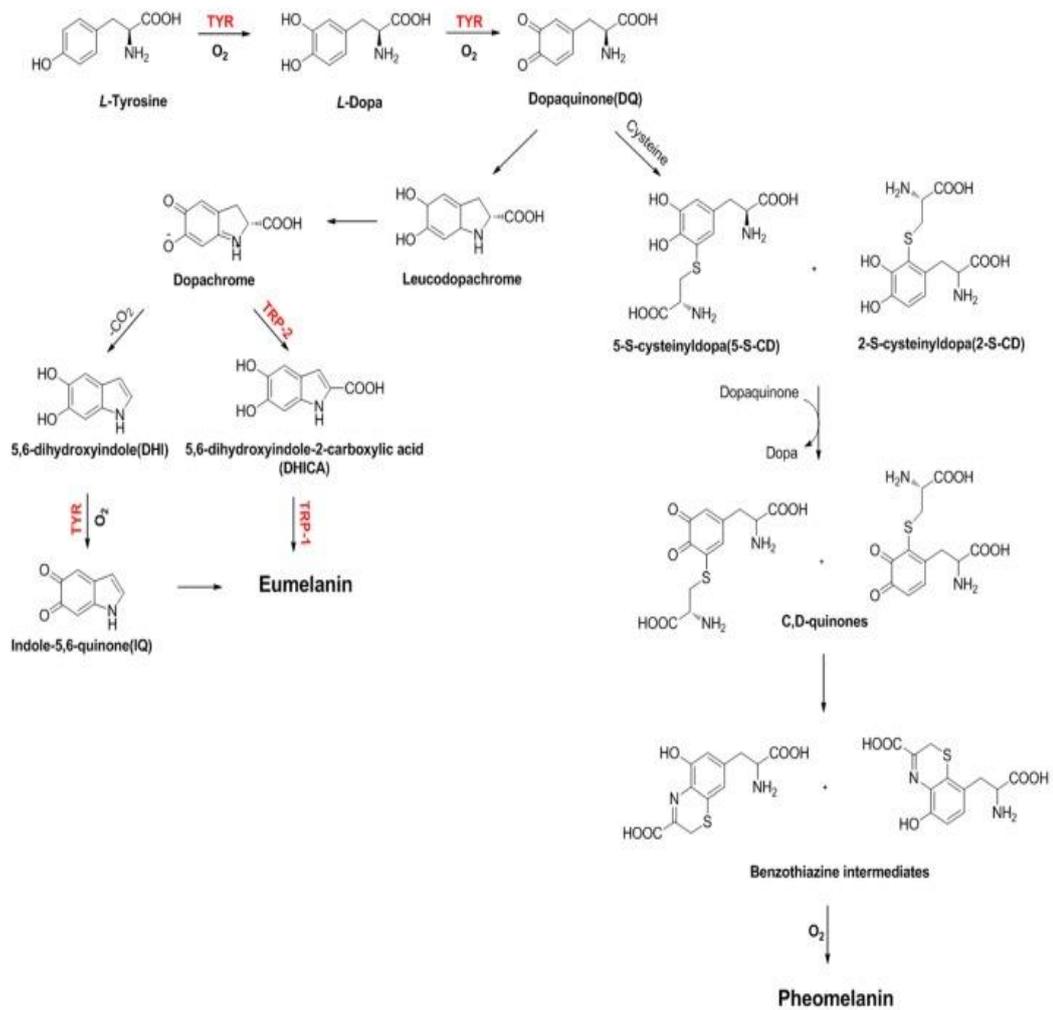


Figure 1.1. La voie de synthèse de la mélanine.

Vue détaillée de la voie de synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine. Cette synthèse débute par l'oxydation de l'acide aminé aromatique L-Tyrosine par la Tyrosinase. La voie de synthèse de la mélanine se sépare ensuite en deux voies distinctes à l'origine de l'eumélanine et de la phéomélanine.

Adapté de (Niu et Aisa, 2017).

1.1.2 Les mélanocytes de la peau et des poils.

La peau des mammifères est un organe gigantesque, structuré en deux couches, l'épiderme et le derme, auxquelles on associe souvent, bien que ne faisant pas partie de la peau, une troisième couche qu'est l'hypoderme. L'épiderme est la couche la plus externe de la peau, elle est au contact du milieu extérieur et du derme (Figure 1.2). Elle est majoritairement composée de kératinocytes, qui jouent à la fois un rôle structurant de maintien de l'intégrité de la peau, et de réponse aux pathogènes par l'activation de la réponse homéostatiques et de l'inflammation (Juráňová *et al.*, 2017; Pastore *et al.*, 2006; Suter *et al.*, 2009).

L'épiderme est divisé en cinq couches : la couche cornée formée par les cellules mortes des couches inférieures, la couche de Malpighi composée de kératinocytes dendritiques et de cellules de Langerhans -les cellules de systèmes immunitaires de la peau-, la couche granuleuse composée de cellules granuleuses plates, la couche claire composée de kératinocytes plats au noyaux atrophiques, et la couche basale composée de cellules souches de kératinocytes servant à alimenter les couches supérieures, des cellules de Merkel responsables de la mécanoréception, et des mélanocytes. Ces mélanocytes ont une forme dendritique, leurs prolongements dirigés vers le haut (Figure 1.2). C'est le long de ces derniers que cheminent les mélanosomes gorgés de mélanine, dont une partie d'entre eux est exportée vers les kératinocytes voisins (Ando *et al.*, 2012).

Le derme est un tissu fibreux composé majoritairement de collagène et de fibres élastiques. La majorité des cellules qui le compose sont les fibroblastes. Le derme a pour principale fonction le support de l'épiderme, à la fois pour l'apport en nutriment et en cellules immunitaires. Il est de ce fait riche en terminaisons nerveuses, ainsi qu'en réseaux lymphatiques et vasculaires. Le derme est composé de deux couches, le derme papillaire, au contact de l'épiderme, et le derme réticulaire en dessous (Zeng *et al.*, 2017).

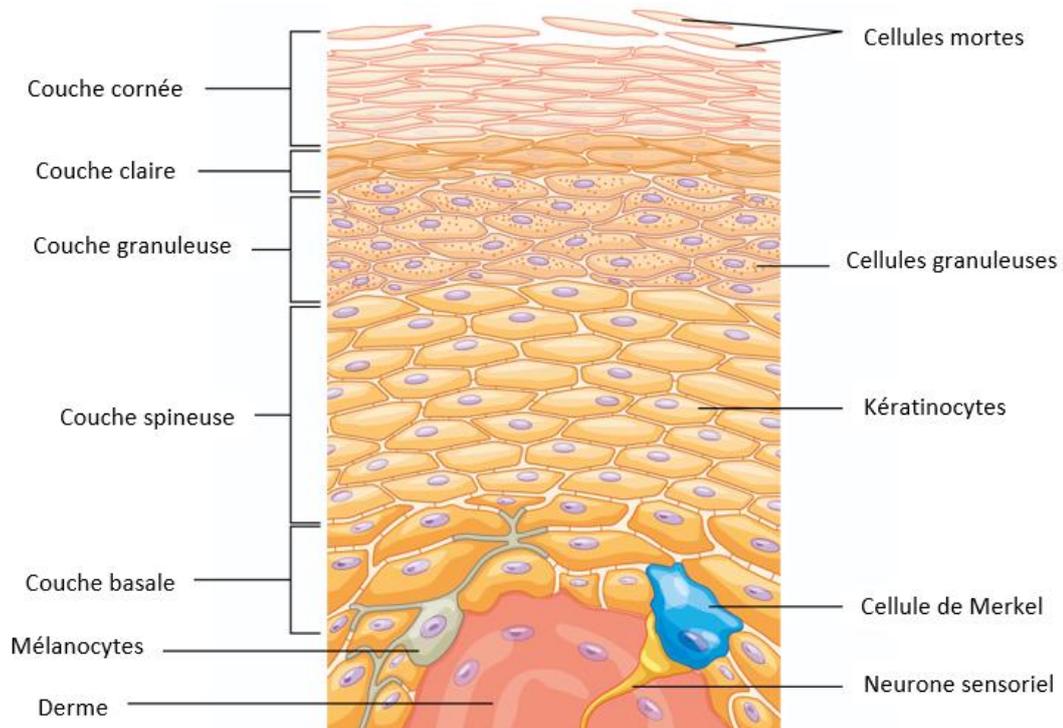


Figure 1.2. Schéma de la structure de l'épiderme.

Schéma des différentes couches et sous-couches de la peau. L'épiderme, majoritairement composé de kératinocytes, est la couche la plus externe de la peau. Il se compose de 5 couches en perpétuel renouvellement à partir de l'intérieur et vers l'extérieur. Cela permet aux cellules mortes externes de former une couche de protection pour les épaisseurs sous-jacentes. Les mélanocytes se trouvent exclusivement dans la couche basale.

Adapté de (J. Gordon Betts, 2013).

Au niveau de la peau, la production de mélanine est médiée par une association signalétique entre kératinocytes et mélanocytes. Sous l'effet des rayonnements ultraviolets (UV), une partie de l'acide désoxyribonucléique (ADN) des kératinocytes peut se retrouver endommager (Pattison et Davies, 2006). Cela entraîne la phosphorylation de p53 qui stabilise la protéine et permet sa fixation sur l'ADN (Lakin et Jackson, 1999), entre autres sur le gène codant pour la proopiomélanocortine (POMC) (Cui *et al.*, 2007). Ce précurseur polypeptidique est ensuite clivé en différents peptides, dont l'hormone mélanocortine (*melanocyte-stimulating hormones ou MSH*) (Raue *et al.*, 2019). Cette dernière est exportée par les kératinocytes et se fixe aux récepteurs de la mélanocortine de type 1 (Melanomortin 1 Receptor ou MC1R) des mélanocytes. Via une cascade signalétique, cela déclenche l'expression du gène codant pour le facteur de transcription associé à la microphthalmie (*Microphthalmia-associated transcription factor MITF*) (Aoki et Moro, 2002), dont certaines cibles sont des gènes impliqués dans la synthèse de la mélanine (Gaggioli *et al.*, 2003). Cela provoque ainsi la production de pigments qui sont alors exportés aux kératinocytes voisins via les mélanosomes (Figure 1.3). Ces derniers se regroupent alors autour du noyau pour former des capsules de mélanine périnucléaires empêchant le passage des UV (Ando *et al.*, 2012) créant ainsi une boucle de rétrocontrôle.

Il en résulte qu'une peau plus claire, pauvre en mélanine ou avec un ratio phéomélanine/eumélanine trop important, est plus susceptible de subir des mutations au niveau de l'ADN et donc de développer des maladies liées à des mutations, telles que, par exemple, des cancers de la peau (Kaidbey *et al.*, 1979). À l'inverse, les populations au teint plus foncé sont moins susceptibles de développer cette maladie, mais leur détection est en revanche bien moins efficace (Gupta *et al.*, 2016). Dans tous les cas, la protection de la peau contre les rayons UV est donc un enjeu crucial de santé publique (Santé-Canada). Pour cela, le moyen le plus répandu et à privilégier est l'utilisation de crème solaire dont les minéraux qui la composent agissent de la même manière que la mélanine : en bloquant les UV.

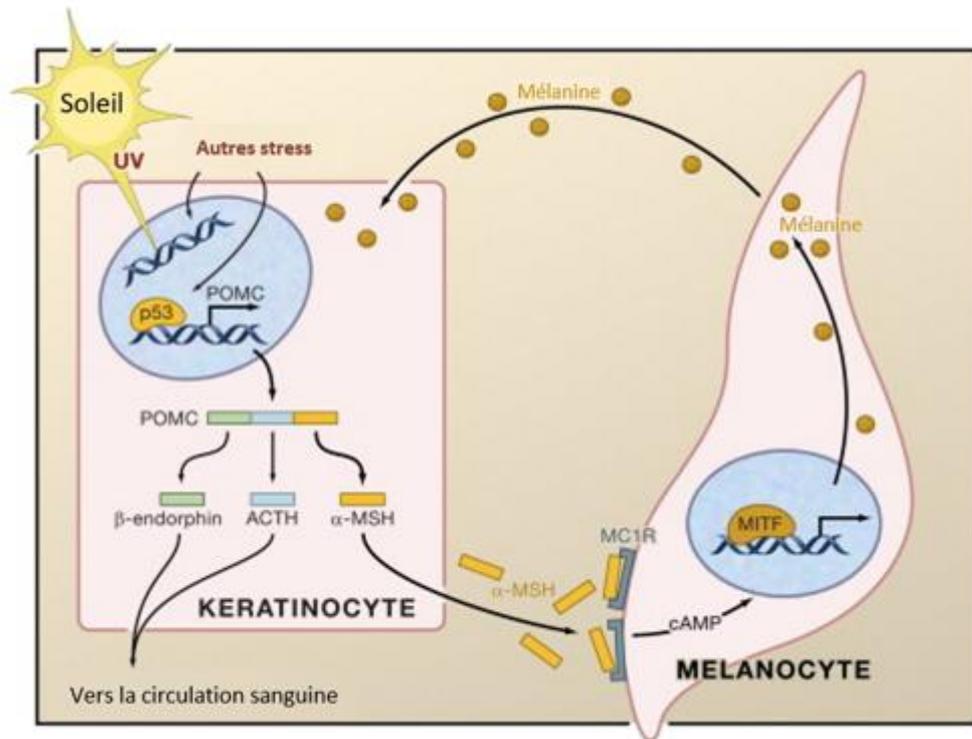


Figure 1.3. Contrôle de la voie de synthèse de la mélanine.

La synthèse de la mélanine est modulée par une boucle de rétrocontrôle négatif mettant en jeu différents types cellulaires. Initialement, c'est la dégradation de l'ADN entraîné par les rayons UV du soleil qui provoque l'activation de p53 dont la stabilisation à l'ADN déclenche l'expression de *POMC*. Le polypeptide *POMC* est fractionnée en différents peptides, dont α -MSH, qui est exporté dans le milieu extracellulaire. Il se fixe au récepteur MC1R des mélanocytes, qui active la voie de signalisation de la protéine kinase A par l'intermédiaire de cAMP. Cela induit alors l'expression de *MITF* qui est un des principaux régulateurs de l'expression des gènes codants pour les enzymes de la synthèse de la mélanine. Cette mélanine est ensuite exportée via les mélanosomes vers les kératinocytes, qui acquièrent ainsi une protection face au rayon UV.

Adapté de (Oren et Bartek, 2007)

Les poils sont des fibres composées en grande partie de kératine. Ils sont structurés en trois couches concentriques : 1/ la medulla au centre, composée de cellules épithéliales et entourée 2/ du cortex, un tube fibreux composé majoritairement de kératine, lui-même entouré par 3/ la cuticule, une couche protectrice de cellules mortes (Yang *et al.*, 2014). Les poils se développent à partir de follicules pileux, qui sont structurés en gaines de deux enveloppes superposées : la racine interne, au contact du poil, et la racine externe en prolongement de l'épiderme. En effet les follicules pileux forment un réceptacle pour le poil, formé à partir de l'invagination d'une partie de l'épiderme dans le derme. Il est composé de différentes structures aux fonctions variées (Picardo *et al.*, 2015) et est relié au système vasculaire par la papille dermique à sa base (Figure 1.4). Dans la partie supérieure, on y trouve la glande sébacée, qui a pour fonction de produire et sécréter le sébum, une huile naturelle lubrifiante et protégeant la peau (Thody et Shuster, 1989). Sous cette dernière, dans la paroi du follicule, juste à côté du muscle érecteur du poil se trouve le bulge, un réservoir de cellules souches et de kératinocytes. Celui-ci contient les cellules souches de mélanocytes (CSM), un groupe de cellules non différencié et dans un état de quiescence, mais exprimant certains marqueurs mélanocytiques (Osawa *et al.*, 2005). Ces cellules souches sont capables de fournir des mélanocytes au reste du follicule (Gola *et al.*, 2012) mais aussi à l'épiderme supérieur (Nishimura, 2011). La partie inférieure du follicule est appelée le bulbe. Elle est séparée par une ligne imaginaire appelée ligne de Auber, qui traverse le bulbe au niveau de sa largeur la plus grande. Au-dessus de cette ligne se trouvent les cellules qui participent à la synthèse du poil, dont les mélanocytes matures et aptes à synthétiser la mélanine exportée ensuite vers le poil pour lui donner sa couleur (Van Raamsdonk et Deo, 2013). Ces mélanocytes expriment les enzymes de la voie de synthèse de la mélanine, mais aussi d'autres marqueurs tels que le récepteur au facteur de croissance des cellules souches KIT (Osawa *et al.*, 2005). KIT appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase. Il est codé par le proto-oncogène *c-Kit* et joue un rôle dans le développement, la différenciation et la migration de certaines cellules. Chez les mélanocytes, il est impliqué dans la régulation de l'expression de

MITF (Jeong et Yoon, 2021) et semble avoir un rôle dans la survie des mélanocytes matures, puisque sa déplétion entraîne leur disparition (Botchkareva *et al.*, 2001). Cette déplétion n'est en revanche pas définitive puisque le rétablissement de l'expression de *c-Kit* permet le retour des mélanocytes matures (Botchkareva *et al.*, 2001). Finalement, le facteur KIT semble également être impliqué dans le déclenchement de la migration des mélanocytes, ce qui aurait pour effet de freiner leur prolifération et différenciation (Alexeev et Yoon, 2006).

En dessous de la ligne de Auber, autour de la papille dermique, se trouve une autre population cellulaire exprimant elle aussi KIT, mais, ne semble-t-il, aucun autre marqueur plus classique des mélanocytes. Cette population est décrite comme étant un bassin de précurseurs de mélanocytes dérivés des CSM du bulge, mais non différenciés, et capables de se différencier en mélanocytes matures. La différenciation de ces cellules en mélanocytes matures serait médiée par le ligand de KIT, aussi appelé KIT-ligand, un facteur de croissance des cellules souches (FCS), synthétisé par des cellules situées au-dessus de la ligne de Auber et entourant les mélanocytes matures (Figure 1.5). La déplétion de FCS empêcherait la maturation de ces précurseurs de mélanocytes (Liao *et al.*, 2017; Zocco et Blanpain, 2017).

Au niveau des follicules, les mélanocytes ont pour fonction principale la synthèse de mélanine, qui donne leur couleur aux poils. Des poils pigmentés absorbent mieux les rayonnements UV et la chaleur associée, protégeant ainsi la peau. C'est la perte des mélanocytes du follicule qui est à l'origine de l'éclaircissement de la couleur des poils qui vient avec le vieillissement.

La principale fonction des mélanocytes de la peau est donc la production de mélanine pour la protection contre les rayonnements ultraviolets. À d'autres endroits, inaccessibles aux UV, les mélanocytes ont d'autres fonctions, plus ou moins liées à leur capacité à produire des pigments.

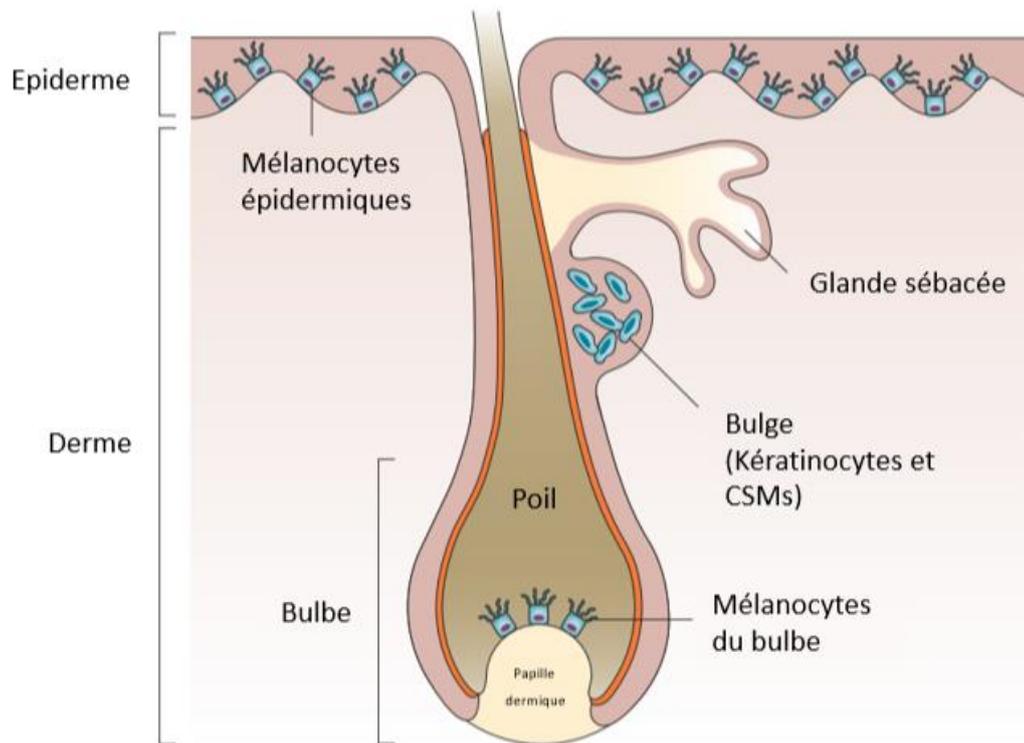


Figure 1.4. Schéma de la structure du follicule pileux.

Le follicule pileux est une invagination de l'épiderme dans le derme. Le bulbe contient les mélanocytes matures, alors que le bulge contient les CSM capables de fournir la couche basale du derme et le bulbe en mélanocytes. La glande sébacée a pour rôle la synthèse et la sécrétion du sébum qui protège la peau des agressions extérieures.

Adapté de (Picardo *et al.*, 2015)

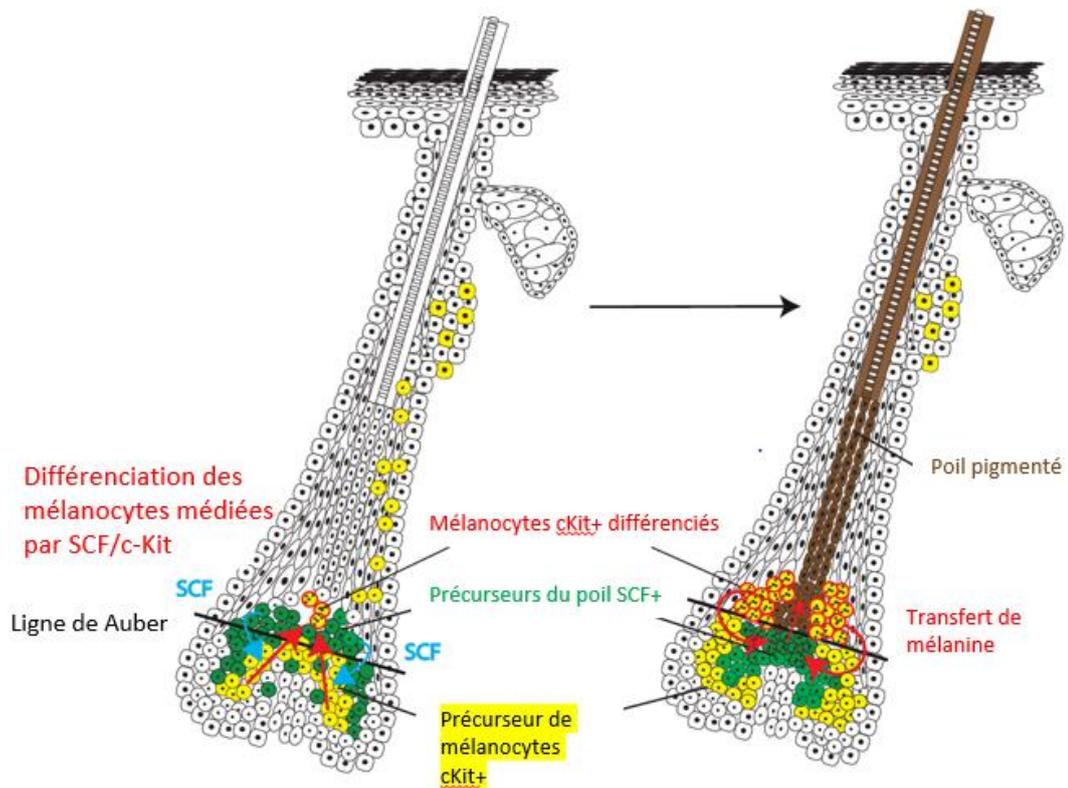


Figure 1.5. Schéma de la différenciation des précurseurs de mélanocytes KIT+ en mélanocytes matures.

C'est la présentation du FCS par des cellules du follicule qui provoquerait la différenciation des précurseurs de mélanocytes KIT+ situés sous la ligne de Auber en mélanocytes matures, et qui entrainerait alors leur migration vers la base du poil, là où ils pourraient jouer leur rôle dans la pigmentation du poil.

Adapté de (Zocco et Blanpain, 2017)

1.1.3 Les mélanocytes de l'oreille interne.

L'oreille interne est l'organe de perception des sons et de l'orientation dans l'espace dont les sièges respectifs sont la cochlée et le vestibule.

La cochlée est un organe en forme de coquille d'escargot. Elle est délimitée à son extrémité par les fenêtres ovale et ronde. La première est en contact direct avec l'étrier, un des trois osselets de l'oreille interne. Elle vibre au rythme des mouvements du complexe osseux enclume-marteau-étrier et fait ainsi bouger la périlymphe. La seconde va être mise en mouvement par les fluctuations de la périlymphe et ainsi transmettre la vibration aux cellules ciliées. À l'intérieur et sur toute sa longueur, la cochlée est subdivisée en trois cavités : la rampe vestibulaire, supérieure, au contact de la fenêtre ovale, le canal cochléaire, médian, et la rampe tympanique, inférieure, au contact de la fenêtre ronde. Les rampes vestibulaire et tympanique sont remplies d'un liquide appelé périlymphe, alors que le canal cochléaire est rempli d'endolymphe. Ce dernier est délimité dans sa partie supérieure par la membrane de Reissner, dans sa partie inférieure par la membrane basilaire, et sur son côté externe par la strie vasculaire. Enfin, sur la membrane basilaire se trouvent l'organe de Corti et la membrane tectoriale.

Un son provoque la vibration des osselets de l'oreille interne. Elle est transmise à la fenêtre ovale, qui entraîne alors le mouvement de la périlymphe puis de la membrane basilaire et l'organe de Corti. À la surface de ce dernier, les stéréocils des cellules ciliées se mettent à onduler, ouvrant ainsi des canaux potassiques qui permettent la captation des ions K^+ présents en une concentration très importante (environ 140 mEq/L) dans l'endolymphe (Smith *et al.*, 1954). Cela dépolarise les cellules ciliées qui rétablissent leur polarisation par expulsion des ions K^+ et absorption d'ions calciques, ce qui entraîne la formation de vésicules d'export de neurotransmetteurs à destination des axones de neurones du nerf vestibulo-cochléaire (Ceriani et Mammano, 2012). C'est ainsi qu'est converti un signal physique initial en signal chimique et finalement en signal électrique (Figure 1.6).

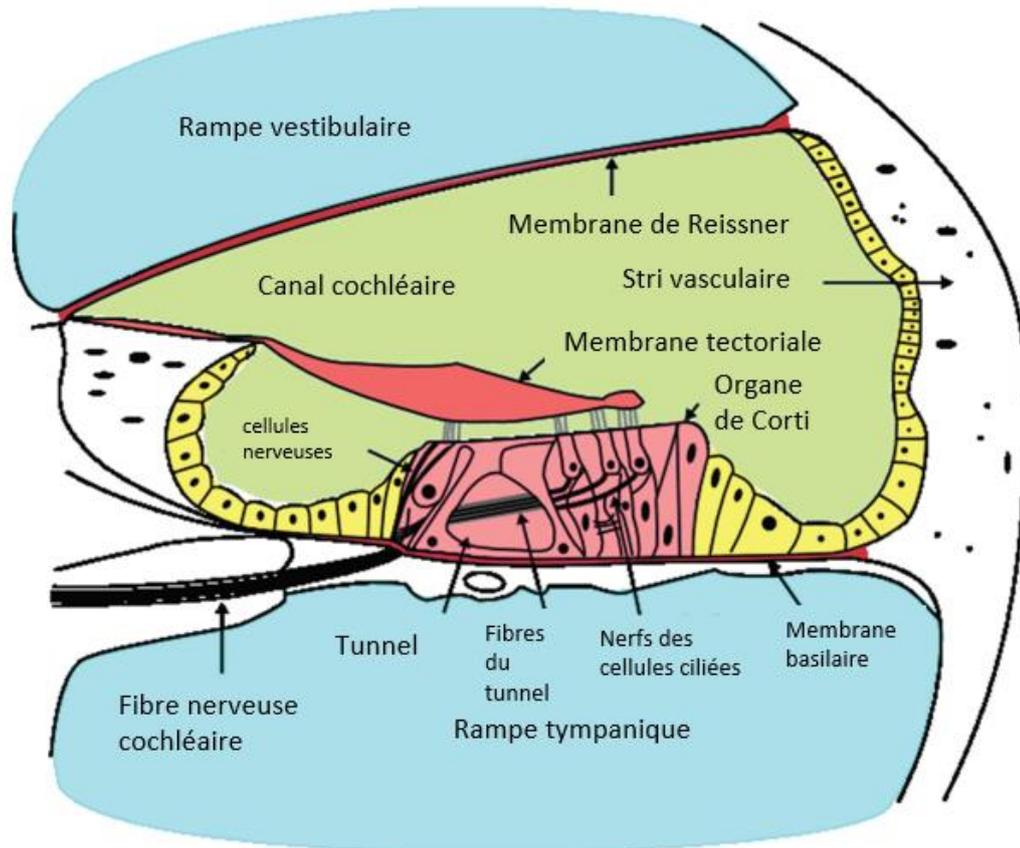


Figure 1.6. Schéma d'une coupe transversale de cochlée.

La cochlée se compose de trois orifices : les rampes vestibulaire et tympanique, et le canal cochléaire. L'organe de Corti, à la jonction entre la rampe tympanique et le canal cochléaire, est l'organe sensoriel de la cochlée. C'est la mise en mouvement des cellules ciliées de l'organe de Corti par la périlymphe qui permet la génération d'un flux d'ions à travers elles et la génération d'un signal nerveux.

Adapté de (Webb, 2009)

Le vestibule est constitué de trois canaux semi-circulaires antérieur, latéral et postérieur, orientés selon des plans X, Y, et Z perpendiculaires les uns par rapport aux autres. Il est rempli d'endolymphe, et les mouvements de cette dernière, dus aux mouvements de la tête, sont captés par les stéréocils des cellules ciliées des trois ampoules situées chacune à l'extrémité d'un canal semi-circulaire, selon le même principe d'absorption des ions K^+ que dans la cochlée. C'est ainsi que sont perçus les mouvements du corps dans les différents plans. Le vestibule est aussi composé de deux organes otolithiques, l'utricule et la saccule, respectivement pour la perception de l'accélération horizontale et verticale (Yoder et Taube, 2009). Ces organes fonctionnent eux aussi grâce aux cellules ciliées, sur lesquels repose la membrane otolithique surmontée par les otolithes, des petits cristaux de carbonate de calcium. La direction et la valeur de force qu'ils exercent sur les cellules ciliées varient selon l'accélération qu'ils subissent, que ce soit la force gravitationnelle, nous permettant de distinguer le haut du bas dans toutes les positions, mais aussi lors d'autres accélérations horizontales ou verticales.

En 1851, Alfonso Giacomo Gaspare Corti décrivit la présence de pigments dans l'oreille interne d'une vache, d'un mouton et d'un vieux chat. Dans les décennies qui suivirent, leur localisation dans les canaux vestibulaires et la strie vasculaire fut établie. Toutefois, ce n'est qu'en 1931 que ces pigments furent considérés comme de la mélanine (Dorothy Wolff, 1931) sans toutefois en identifier la source. En 1977 Hilding et Ginzberg mirent en évidence que les cellules pigmentées de la strie vasculaire de la cochlée sont des mélanocytes qui sont alors appelés *cellules intermédiaires* (Hilding et Ginzberg, 1977). Il a plus tard été mis en évidence qu'il était possible d'observer d'autres mélanocytes cochléaires autour des vaisseaux sanguins, à proximité de la fibre nerveuse cochléaire, et le long des membranes basale et de Reissner (van Beelen *et al.*, 2020) (Figure 1.6). Les mélanocytes de la cochlée ont un rôle essentiel pour le développement de la strie vasculaire, et leur déplétion peut entraîner des troubles de l'audition (Schrott et Spöndlin, 1987; Steel et Barkway, 1989).

Dans le vestibule, on peut observer des mélanocytes dans l'utricule, la saccule et les canaux semicirculaires (van Beelen *et al.*, 2020) (Figure 1.7). Ils se trouvent de manière privilégiée dans les zones des cellules épithéliales sombres (*dark cells*) (LaFerriere *et al.*, 1974), mais comme pour la cochlée, il est possible d'en observer autour des vaisseaux sanguins, des nerfs, et plus largement dans le tissu conjonctif sous épithélial (Figure 1.7).

Les mélanocytes de l'oreille interne, ont principalement pour fonction de maintenir la composition du liquide endolymphatique, et plus particulièrement l'importante concentration en ions K^+ de l'endolymphe. En effet, l'absorption des ions K^+ par les cellules ciliées doit être compensée par un mécanisme d'approvisionnement. C'est la périlymphe, le liquide circulant autour des cavités endolymphatiques principales de la cochlée et du vestibule, qui alimente celles-ci en ion K^+ . Des cellules captent ces ions et les font circuler par l'intermédiaire de jonctions communicantes jusqu'aux mélanocytes du vestibule et cellules intermédiaires de la cochlée (Figure 1.8). Les mélanocytes du vestibule, associés aux cellules épithéliales sombres, transmettent à ces dernières les ions K^+ qui sont ensuite expulsés dans l'endolymphe au moyen de pompes Na^+/K^+ ATPses. Dans la cochlée, les cellules intermédiaires alimentent l'espace intrastrial en ions, qui sont ensuite captés par les cellules marginales, dont le fonctionnement est le même que les cellules épithéliales sombres. (Figure 1.8). Par l'intermédiaire du maintien de composition du liquide endolymphatique, les mélanocytes jouent donc un rôle essentiel dans le fonctionnement de la cochlée et du vestibule. Ainsi, un dysfonctionnement de ces cellules peut mener à des perturbations des fonctions de ces organes (Bergeron *et al.*, 2016; Patuzzi, 2011).

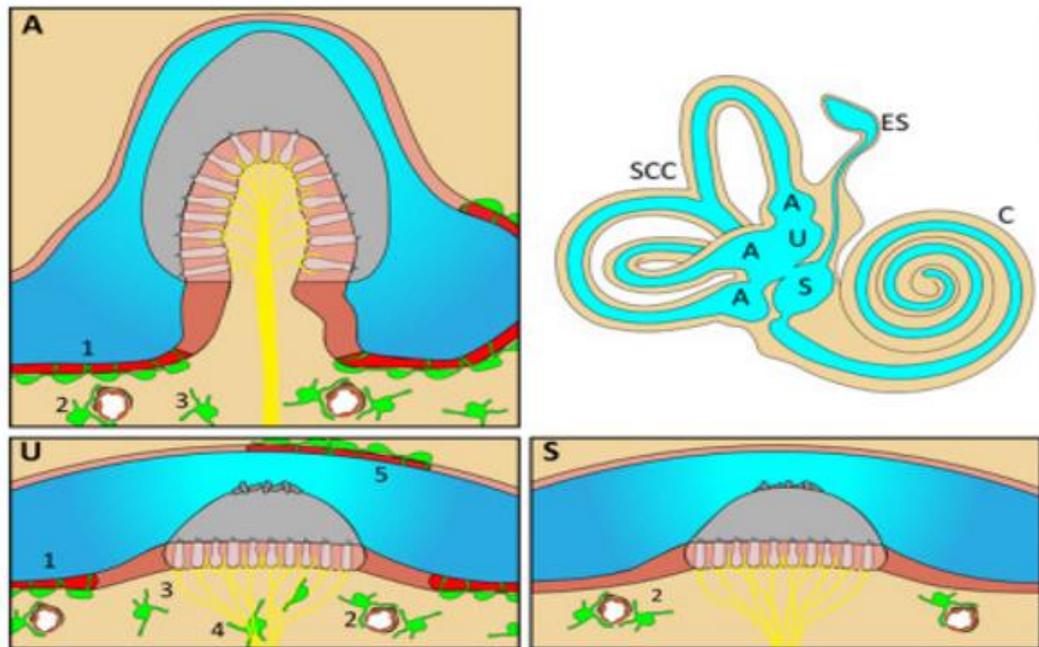


Figure 1.7. Schéma des différentes structures du vestibule.

Le vestibule est constitué de trois canaux semi-circulaires reliés aux trois ampoules (A) et de deux organes otolithiques, l'utricule (U) et la saccule (S) (Yoder et Taube, 2009). Des mélanocytes (vert) peuvent être (1) au contact des cellules épithéliales sombres, (2) autour des vaisseaux sanguins, (3) dans le tissu conjonctif sous épithélial, (4) autour des fibres nerveuses et (5) associés aux cellules épithéliales sombres du toit de l'utricule. On trouve aussi des mélanocytes dans la croix commune reliant les canaux semi-circulaires antérieur et postérieur.

Adapté de (van Beelen *et al.*, 2020)

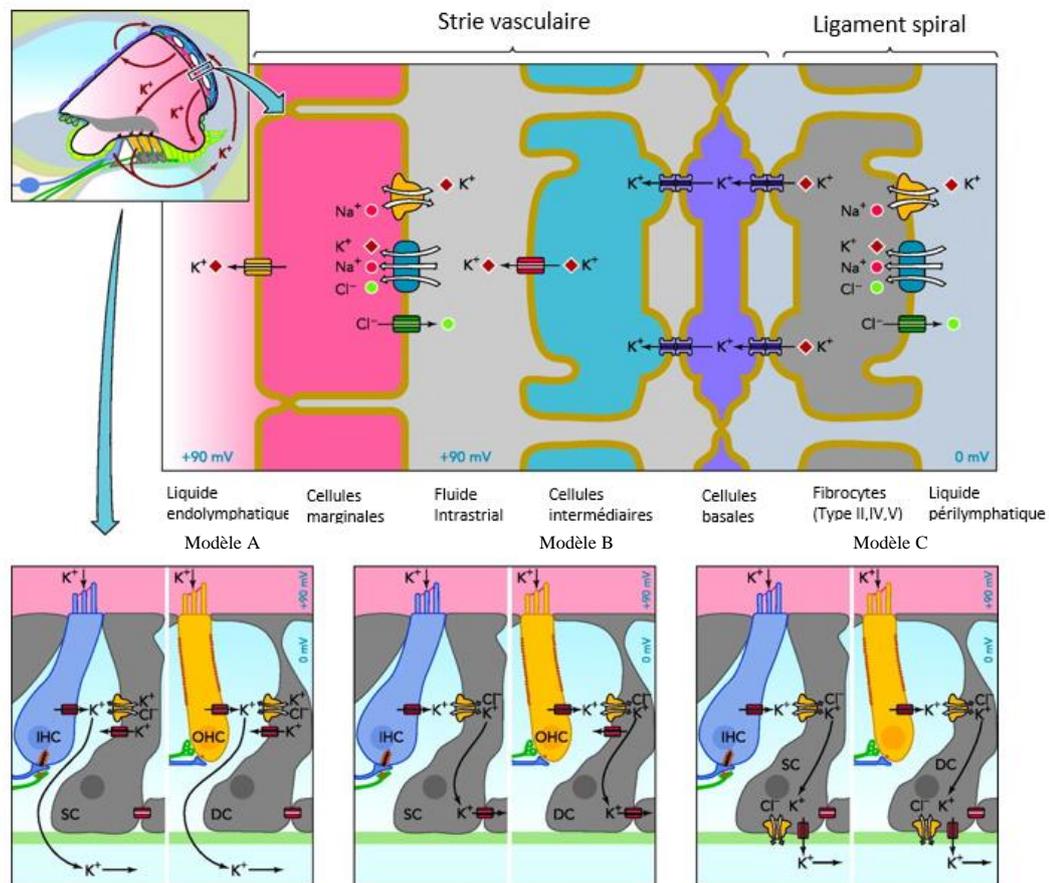


Figure 1.8. Schéma du fonctionnement des canaux ioniques de la cochlée.

Au niveau de la strie vasculaire, c'est la coordination des différentes couches de cellules qui permet le maintien de la composition du liquide endolymphatique en ions. Les mélanocytes, ou cellules intermédiaires, transmettent les ions potassium vers les cellules marginales qui les font elles-mêmes passer dans l'endolymphe. Le potassium est un ion clé dans le fonctionnement des cellules ciliées pour la création du signal auditif. Le modèle A postule que le K^+ libéré par les cellules ciliées retourne à la stria vascularis à travers l'espace périlymphatique ouvert, tandis que le modèle B implique le recyclage du K^+ à travers les cellules de soutien (SC). Ces cellules agissent comme un tampon K^+ dans le modèle C.

Adapté de (Zdebik *et al.*, 2009)

Etonnamment, la mélanine ne semble avoir qu'un rôle mineur dans l'oreille interne. En effet, les souris albinos FVB dont le gène codant pour la tyrosinase n'est plus fonctionnel, conservent leur capacité auditive et d'orientation dans l'espace (Bartels *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2017; Tachibana, 1999). La mélanine pourrait toutefois jouer un rôle dans la protection et le maintien de l'intégrité du système auditif, entre autres via sa capacité antioxydative (Ho *et al.*, 2014). Ainsi, la présence accrue de mélanine pourrait être à l'origine d'une meilleure protection contre les formes réactives de l'oxygène chez les personnes de couleur (Helzner *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2014). Il n'a en revanche pas été étudié si la mélanine pouvait avoir un rôle dans le maintien du fonctionnement du vestibule.

Bien que principalement associés à la peau, et dans une moindre mesure à l'oreille interne, les mélanocytes sont aussi présents dans d'autres parties du corps, dans lesquelles leur fonction n'est pas toujours bien définie.

1.1.4 Les mélanocytes du reste du corps.

Plusieurs autres organes possèdent des mélanocytes.

Ainsi, on trouve des mélanocytes dans certaines parties du cœur, plus particulièrement au niveau du septum auriculaire, de la valve mitrale, de la valve tricuspide et de la valve aortique (Yajima et Larue, 2008). Ces mélanocytes sont fonctionnels et produisent de la mélanine, mais leur fonction ne semble pas être principalement reliée à cette dernière. Ils jouent un rôle mécanique de maintien de la rigidité des différentes valves (Balani *et al.*, 2009), mais aussi dans la régulation du rythme cardiaque par l'intermédiaire de la Dopacrome Tautomérase (DCT), dont les propriétés de contrôle des flux calcique sont importantes pour la contraction du cœur (Hwang *et al.*, 2015). Ainsi, un défaut dans la synthèse de cette enzyme peut être à l'origine d'arythmie cardiaque (Levin *et al.*, 2009).

Les mélanocytes sont aussi présents au niveau des yeux, auxquels ils donnent leur couleur. Cette dernière varie selon la quantité de mélanine produite par les mélanocytes de l'iris, et par le type de mélanine (phéo- ou eumélanine) (Sturm et Frudakis, 2004). On retrouve des mélanocytes dans l'uvée, et plus particulièrement dans l'iris, le corps ciliaire et la choroïde (Costache *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2002). Ils ont un rôle important dans le contrôle de l'angiogenèse, dans la régulation de la réponse immunitaire (Bronkhorst et Jager, 2013; Sitiwin *et al.*, 2019), et bien évidemment dans la régulation du stress oxydatif et l'absorption des rayonnements UV par l'intermédiaire de la mélanine.

Enfin, on retrouve des mélanocytes au niveau du cerveau dans la méninge (Gudjohnsen *et al.*, 2015). Leur fonction à cet endroit n'est pas encore connue, mais il pourrait jouer un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire (Miniati *et al.*, 2014; Tsatmali *et al.*, 2002).

Il peut exister des cas particuliers de présence anormale de mélanocytes dans des organes n'en contenant habituellement pas. Ainsi, dans des cas de cancers liés à ce type cellulaire, appelé mélanome, des mélanocytes peuvent générer des métastases dans différentes parties du corps. Les poumons par exemple, sont particulièrement touchés par le développement des tumeurs malignes de mélanomes (Borghesi *et al.*, 2019).

1.2 Le développement des mélanocytes.

Les mélanocytes sont des cellules dérivées de la crête neurale (CN), une structure embryonnaire spécifique des vertébrés, située dans la partie dorsale du tube neural (TN), et qui s'étend sur la quasi-totalité de cet axe craniocaudal (Osorio *et al.*, 2009). Sa formation débute durant l'embryogenèse à de la gastrulation, pendant la neurulation, et elle donne naissance à une grande variété de types cellules.

1.2.1 La crête neurale.

La formation de la CN est une des étapes importantes de l'embryogenèse. Après la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde, le zygote entre dans la phase de segmentation durant laquelle il subit une succession de divisions cellulaires pour finir par former un blastocyste organisé en trophoblaste, blastocèle et embryoblaste. Ce blastocyste entre alors en phase de gastrulation durant laquelle il se réorganise en trois feuillets : l'endoderme le plus interne, le mésoderme intermédiaire, et l'ectoderme le plus externe. Chacun de ces trois feuillets est à l'origine de la grande variété de cellules, tissus et organes qui composent l'organisme.

Les cellules de l'endoderme, qui ne représentent pourtant qu'une petite partie du nombre total des cellules de l'embryon (Nowotschin *et al.*, 2019), passent par des processus de transitions épithélio-mésenchymateuses, migrations collectives et transitions mésenchymato-épithéliales pour donner naissance aux différents

épithéliums des voies digestives et respiratoires ainsi qu'à certains organes tels que la thyroïde, le foie, le pancréas, la prostate et la vessie (Wlizla et Zorn, 2015). Le mésoderme se subdivise quant à lui en plusieurs structures singulières.

Le mésoderme axial se différencie ensuite en notochorde pour servir de support physique mais aussi de source de molécules de signalisation pour le développement du tube neural (Kahane et Kalcheim, 2020) et participer à la formation des disques intervertébraux (Smits et Lefebvre, 2003). Le mésoderme paraxial dérive en somites, à l'origine des côtes (Evans, 2003), de la partie dorsale du derme (Olivera-Martinez *et al.*, 2000) et d'une partie des muscles squelettiques (Buckingham *et al.*, 2003). Le mésoderme intermédiaire donne naissance aux gonades et aux reins. Et enfin le mésoderme de la plate latérale forme quant à lui les cellules progénitrices qui constituent le cœur et le système cardiovasculaire, le sang, les reins, la lignée de muscles lisses et les os des membres (Prummel *et al.*, 2020).

L'ectoderme, quant à lui, se différencie en trois populations de cellules : la plaque neurale dans sa partie centrale, la CN au niveau de la bordure de la plaque neurale (Milet et Monsoro-Burq, 2012), et l'épiderme primitif dans sa partie la plus externe.

Par la suite, la neurulation primaire débute dans la partie médiane de l'embryon. La plaque neurale s'invagine en son centre, ce qui entraîne le rapprochement des feuillets épidermiques et des deux extrémités de la CN qui fusionnent, entraînant la formation du tube neural à partir de la circularisation de la plaque neurale (Smith et Schoenwolf, 1997). Ce processus s'étend vers les parties crâniale et caudale, sur toute la longueur de l'embryon, et s'accompagne de la fermeture de l'épiderme au-dessus du tube neural. Ce dernier est à l'origine du cerveau et de la moelle épinière, alors que la destinée des cellules de la crête neurale est plus variée.

Une fois le tube neural clos, les cellules de la crête neural subissent une transition épithélio-mésenchymateuse qui entraîne leur séparation du tube neural (Ahlstrom et Erickson, 2009) (Figure 1.9).

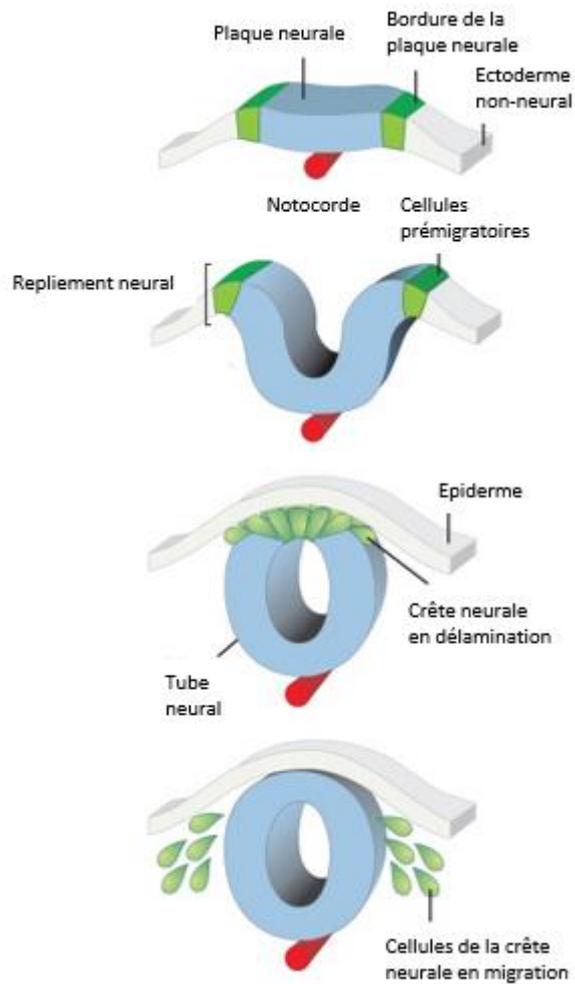


Figure 1.9. Schéma du processus de formation de la crête neurale.

La formation de la CN est un processus embryonnaire qui débute par le repliement de la plaque neurale sur elle-même, suivi de la délamination de la CN du tube neural. S'en suit alors la migration des cellules de la crête neurale dans tout l'organisme.

Adapté de (Simoes-Costa et Bronner, 2015)

Ces cellules de la crête neurale migratoire et multipotente peuvent ainsi coloniser l'embryon au complet. Par la suite, ces cellules multipotentes vont entrer dans un processus de différenciation cellulaire médiées par des voies de signalisations spécifiques (Figure 1.10). Elles donnent ainsi naissance à un grande variété de types cellulaires, tels que des cellules mésenchymateuses (ostéoblastes, chondroblastes), neurales (neurones sensoriels, cellules gliales), sécrétrices (système endocrine) et pigmentées (mélanocytes) (Ivashkin et Adameyko, 2013; Pilon, 2021; Simoes-Costa et Bronner, 2015). La colonisation des cellules de la crête neurale a lieu progressivement dans le temps en descendant le long de l'axe cranio-caudale. Selon leur localisation le long de cet axe, les cellules de la crête neurale peuvent être classées en 4 sous-populations (Figure 1.11), qui pour point commun de toutes pouvoir générer des mélanocytes et des cellules de Schwann (Pilon, 2021), mais nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux mélanocytes crâniens et du tronc :

- les cellules crâniens donnent naissance aux cartilages, os, neurones crâniens, cellules gliales (Charrier et Pilon, 2017; Cordero *et al.*, 2011) et mélanocytes (Adameyko *et al.*, 2012).
- les cellules vagues migrent le long de l'intestin primitif pour se différencier en neurones et cellules gliales du système nerveux entérique (Anderson *et al.*, 2006). Un sous type de cellules de la crête neurale vagues appelées cellules de la crête neurale cardiaques sont, elles, à l'origine de certaines structures du cœur (Jiang *et al.*, 2000; Pilon, 2021).
- les cellules du tronc donnent naissance aux neurones et aux cellules gliales des ganglions de la racine dorsal et ganglions sympathiques (Dushane, 1938; Kasemeier-Kulesa *et al.*, 2005; Pilon, 2021), alors que celles qui migrent en direction de la peau le long de l'épiderme ou des nerfs se différencient en mélanocytes (Adameyko *et al.*, 2009).
- les cellules sacrales contribuent, pour une plus petite partie que les vagues, au système nerveux entérique (Wang *et al.*, 2011).

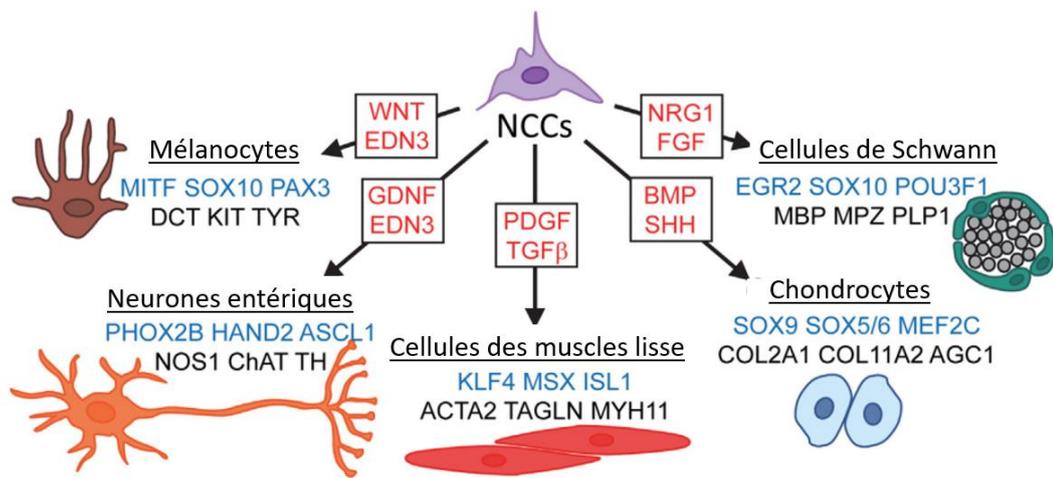


Figure 1.10. Vu d'ensemble de quelques voies de régulations géniques impliquées dans la différenciation des cellules de la crête neurale.

En même temps qu'elles colonisent la totalité de l'organisme, les cellules de la crête neurale entre dans un processus de différenciation médiée par différentes voies de signalisation (rouge) et facteurs de transcriptions (bleu). Cela permet la génération d'une grande variété de types cellulaires.

Adapté de (Pilon, 2021)

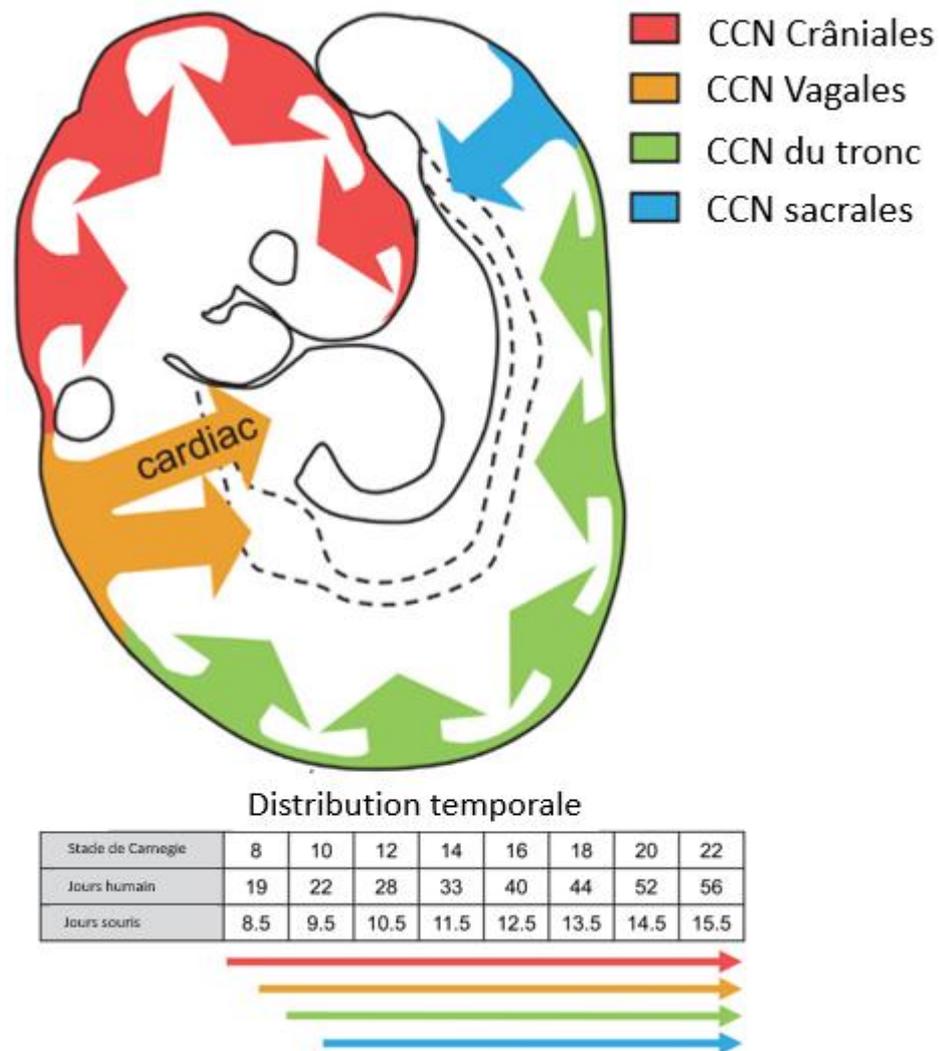


Figure 1.11. Schéma des sous-populations cellulaires de la crête neurale. Les cellules de la crête neurale donnent naissance à différents types de cellules selon la fraction à laquelle elles appartiennent : crâniales, vagales, du tronc et sacrales. La migration de ces cellules se fait en décalé dans le temps, les plus antérieures débutant leur migration avant les plus postérieures.

Adapté de (Pilon, 2021)

Au niveau du tronc, il existe deux voies de migration des cellules de la crête neurale. La première voie, dorsoventrale, dans laquelle les cellules migrent vers le centre de l'embryon en passant à travers ou à côté des somites, le long des nerfs. Ces cellules se différencient en neurones et en précurseurs de cellules de Schwann (PCS) (Furlan et Adameyko, 2018) à l'origine des cellules de Schwann (CS) du système nerveux périphérique (Barlow-Anacker *et al.*, 2017), un sous type de cellules gliales. La seconde voie, dorsolatérale, dans laquelle les cellules de la crête neurale migrent entre les somites et l'ectoderme (Ruhrberg et Schwarz, 2010), et qui donne naissance aux mélanocytes (Figure 1.12) (Schilling et Le Pabic, 2014).

Comme au niveau du tronc, certaines cellules de la crête neurale crânielles cheminent le long des nerfs crâniels pour se différencier en cellules gliales et mélanocytes (Kaucka *et al.*, 2021) alors que d'autres migrent le long de l'épiderme primitif pour donner naissance à des mélanocytes et aux autres dérivés crâniels.

À part pour de très rares exceptions (Frunchak et Milos, 1990), il a longtemps été considéré que la voie canonique pour la migration des mélanocytes était la voie dorsolatérale, le long de l'ectoderme. Il existait toutefois des indices suggérant une possible voie alternative passant par un stade intermédiaire de PCS, tel que par exemple, la proximité entre les PCS et les mélanocytes. En effet, ces deux types cellulaires ont les mêmes cellules précurseurs, si bien qu'une culture de cellules de la crête neurale génère, *in vitro*, des PCS, des neurones et des mélanocytes (Dupin *et al.*, 1990). Mais le lien est encore plus étroit entre ces deux types cellulaires, puisque des mélanocytes au contact de l'endotheline 3 peuvent se différencier en précurseurs glio-mélanocytique puis se différencier en CS (Dupin *et al.*, 2000). Ce n'est que plus récemment qu'a été mise en évidence *in vivo*, par des expériences d'ablation et de traçage cellulaire (Adameyko *et al.*, 2009), une nouvelle voie de migration des mélanocytes, colonisant la peau après avoir cheminé le long des nerfs sous forme de PCS.

Si elles ont en commun le point de départ et l'état à l'arrivée, ces deux voies de migration varient en revanche à la fois du fait de leur trajet physique, de leur temporalité, et des différents états par lesquels elles passent. Elles complexifient encore d'avantage l'étude du développement des mélanocytes, et apportent un éclairage nouveau sur les différentes perturbations qui peuvent toucher ce dernier dans certaines maladies. Il est donc primordial de les comprendre.

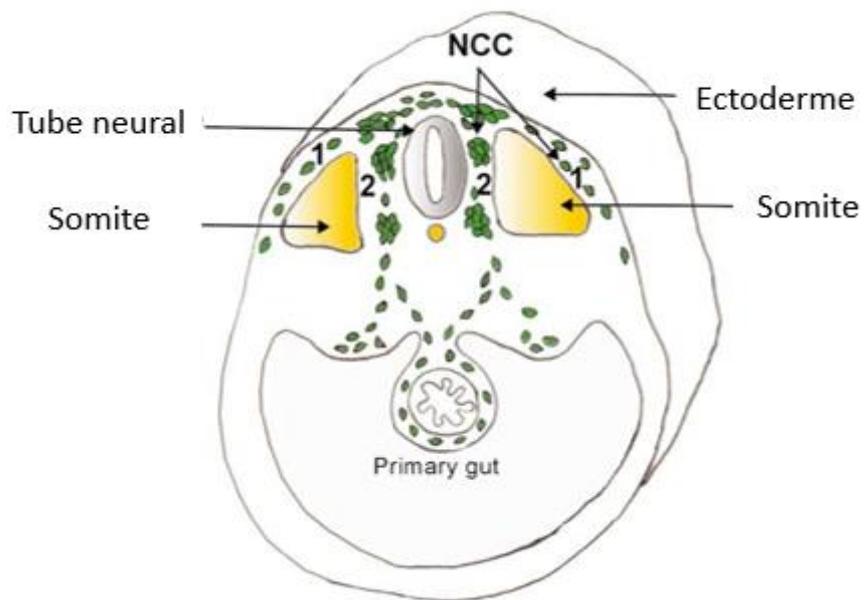


Figure 1.12. Schéma des deux voies de migrations des cellules de la crête neurale. Au niveau du tronc, les cellules de la crête neurale empruntent deux voies de migration : (1) la voie dorsolatérale qui longe l'ectoderme, et (2) la voie ventrale qui passe le long des nerfs, entre les somites et le tube neural.

Adapté de (Cichorek *et al.*, 2013)

1.2.2 La voie de migration dorsolatérale.

Chez la souris, les premières cellules de la crête neurale du tronc délaminent en direction dorsale vers 10.5 jours embryonnaires (e10.5) (Ruhrberg et Schwarz, 2010). Ces cellules commencent alors à s'engager dans la voie mélanocytaire en exprimant certains marqueurs tels que MITF et DCT à e11.5 (Baxter et Pavan, 2003) tout en migrant le long du mésoderme, sous l'ectoderme (Figure 1.13). À ce stade, ces cellules ne sont pas encore différenciées en mélanocytes matures et ne produisent pas de mélanine. On les appelle alors mélanoblaste. Des expériences de chimères entre des embryons de souris pigmentés et albinos ont permis de mettre en évidence que cette migration avait lieu de manière symétrique mais indépendante de part et d'autre du tube neural (Mintz, 1967). Les mélanoblastes se regroupent ensuite dans une zone de transit (Migration Staging Area MSA) située entre le tube neural, le somite et l'épiderme (Wehrle-Haller et Weston, 1995), pour y proliférer. Ils reprennent ensuite leur migration dans le mésoderme. À ce stade, le mésoderme et l'ectoderme acquièrent leurs caractéristiques définitives de derme et épiderme.

À partir de e12.5, on observe que, alors que certains mélanoblastes restent dans le derme où ils continuent d'y proliférer, une grande partie se met à migrer vers l'épiderme pour s'y trouver en majorité à partir de e13.5 (Luciani *et al.*, 2011). Le stock de mélanoblastes du derme reste constant mais continue de proliférer en exportant ses néo-mélanoblastes vers l'épiderme, dans lequel ces derniers prolifèrent et migrent aussi. Ils se caractérisent alors, entre autres, par l'expression de la *Tyrosinase* et de *Tyrp1*, deux enzymes impliqués dans la synthèse de la mélanine (Guyonneau *et al.*, 2004). La migration de ces mélanoblastes est contrôlée par l'expression importante de molécules d'adhésion, telles que les cadhérines E et P (Nishimura *et al.*, 1999). La prolifération des mélanoblastes dans le derme et l'épiderme est contrôlée indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, des mutations des gènes codant pour les facteurs peau noire dominante (*dsk*) 1 et 7 entraînent une forte augmentation du nombre de mélanoblastes dans le derme, mais pas dans l'épiderme (Van Raamsdonk *et al.*, 2004). Ce processus, finement contrôlé,

continue durant tout le développement de la peau. Commence alors une phase de différenciation des mélanoblastes en CSM caractérisé par l'expression de *Pax3*. *Pax3* fait partie des gènes clés dans le développement des mélanocytes puisque la protéine qu'il code est capable de contrôler à la fois à la hausse l'expression de *Mitf* et à la baisse l'expression de *Dct*. Il a été montré qu'il agit en compétition avec SOX10 pour la liaison à MITF et à l'élément amplificateur en amont de la séquence codant pour *Dct* (Osawa *et al.*, 2005). L'expression de *Pax3* maintient donc les CSM dans un état indifférencié capable de proliférer. Les CSM forment la réserve de cellules souches des mélanocytes et une partie d'entre eux pourra migrer et se différencier en mélanocytes matures et producteurs de mélanine en passant par deux étapes intermédiaires (Figure 1.13).

Au niveau de la tête, plusieurs vagues successives de mélanoblastes colonisent la peau du crâne à partir de e11.5 (Adameyko *et al.*, 2012; Kaucka *et al.*, 2021).

La voie de migration dorsolatérale des mélanocytes a longtemps été considérée comme l'unique source pour la colonisation de la peau. Pourtant, en 2009, il a été montré que chez l'embryon, l'ablation du tube neural bloque logiquement le développement des mélanocytes, mais que l'ablation de la partie de la peau proche du tube neural a un faible impact sur le nombre de mélanocytes. De plus, les mélanocytes capables de coloniser la peau sans passer le long du derme semblaient provenir des nerfs adjacents (Adameyko *et al.*, 2009). Cette première observation a ouvert la voie à une nouvelle origine des mélanocytes, via l'existence d'une autre voie de migration pour ces derniers, la voie dorso-ventrale.

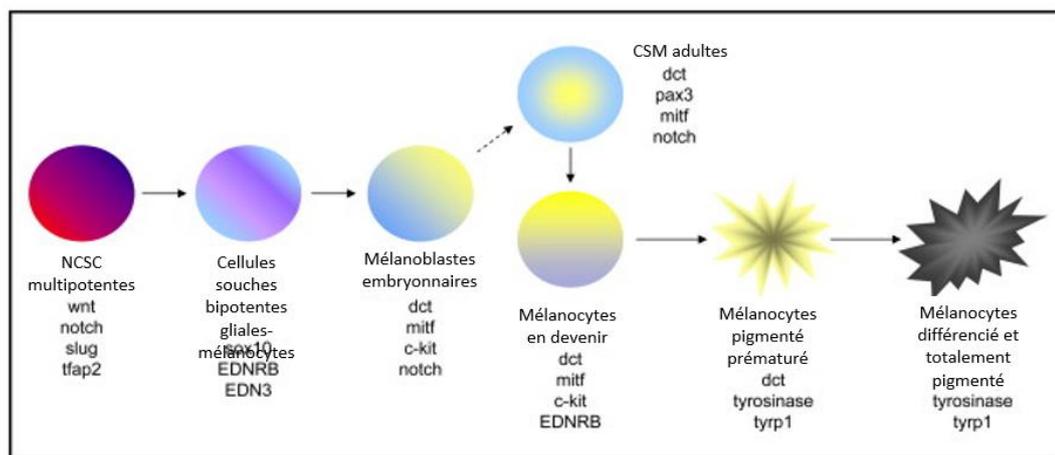


Figure 1.13. Stades de différenciation direct des cellules de la crête neurale en mélanocytes.

Certains mélanocytes dérivent directement des cellules de la crête neurale en passant par différents stades intermédiaires, caractérisés par l'expression de certains gènes, et dont la prolifération et la différenciation sont contrôlées par différentes voies de signalisation.

Adapté de (White et Zon, 2008)

1.2.3 La voie de migration ventrale.

Au niveau du tronc chez la souris, certaines cellules de la crête neurale exprimant *Sox10* et *Sox9*, engagées à partir de e8.5 dans la voie de migration ventrale (Ackerman et Monk, 2016; Ruhrberg et Schwarz, 2010; Serbedzija *et al.*, 1990), prolifèrent sous la dépendance de la voie de signalisation EDN3/EDNRB (Endothéline 3/ Recepteur à l'endothéline de type B) (Saldana-Caboverde et Kos, 2010). Elles sont alors considérées comme bipotentes gliales-mélanocytes (Mull *et al.*, 2015). Ces cellules s'engagent ensuite dans la voie des précurseurs de cellules de Schwann en exprimant *ErbB2* (Garratt *et al.*, 2000), *ErbB3* (Lyons *et al.*, 2005), la protéine myélinisante zéro (*Mpz*) (Kim *et al.*, 2017), la protéine protéolipidique (*Plp*) (Buchstaller *et al.*, 2004) et Desert hedgehog (DHH) (Parmantier *et al.*, 1999b). Elles cheminent le long des axones des neurones en formation, pour certains aussi dérivés des cellules de la crête neurale. Certaines de ces PCS acquièrent ensuite une identité de cellules de Schwann immature avec l'expression des marqueurs *SI00β* (Liu *et al.*, 2015) et *Cnp* (Sundaram *et al.*, 2021) en plus des précédents. Elles se séparent ensuite en deux populations cellulaires distinctes, l'une produisant la gaine de myéline autour des axones des neurones et la seconde non (Figure 1.14) (Jessen et Mirsky, 2005; Macklin et Rasband, 2012). Les gènes *Krox-20* et *Oct-6* semblent jouer un rôle essentiel pour le développement des cellules de Schwann myélinisantes (Jessen et Mirsky, 2002).

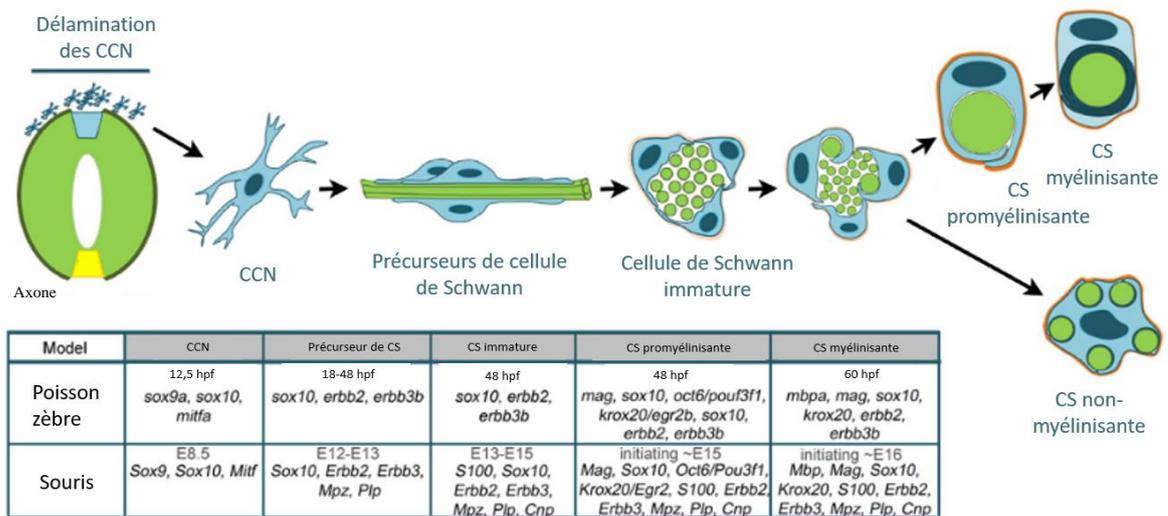


Figure 1.14. La lignée des cellules de Schwann.

Les CS dérivent des cellules de la crête neurale. Elles passent par des stades intermédiaires de PCS et de cellule de Schwann immature avant d'acquérir leur identité finale de CS myélinisante ou non. Les premières forment les gaines de myéline autour des axones, alors que les secondes possèdent dans leur cytoplasme des invaginations appelées fibre de Remak, par lesquelles passent les axones des neurones.

Adapté de (Ackerman et Monk, 2016)

Ainsi, les PCS sont des cellules multipotentes capable de migrer le long des axones (Furlan et Adameyko, 2018) en développement. Cette capacité en fait de très bonnes candidates pour coloniser le corps de manière efficace. Elles expriment des marqueurs communs avec les cellules de Schwann matures, tels que la protéine protéolipidique 1 (PLP1) et DHH. Étant donnée leur proximité avec les axones, elles ont longtemps été considérées comme étant exclusivement destinées à se différencier en cellules de Schwann (Jessen et Mirsky, 2005), mais des découvertes du début du 21^{ème} siècle ont remis cela en question (Furlan et Adameyko, 2018). Par exemple, il a été démontré que certains ganglions parasympathiques dérivent de PCS (Espinosa-Medina *et al.*, 2014), ainsi qu'un certain nombre de neurones du système nerveux entérique (SNE) (Uesaka *et al.*, 2015). Elles sont aussi à l'origine de certaines cellules mésenchymateuses des dents pour leur formation, leur renouvellement et leur réparation (Kaukua *et al.*, 2014).

Le système *Cre-loxP* permet le traçage de lignée cellulaire par association entre un promoteur rapporteur d'intérêt et une construction rapportrice. Par exemple, le croisement de souris *Plp1-Cre^{ERT2}* avec des *Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* permet de tracer les cellules dérivées des cellules ayant exprimé *Plp1*. C'est par exemple ce système qui a permis de mettre en évidence la part des PCS dans le développement des dents (Kaukua *et al.*, 2014). En effet, l'internalisation, par ajout de Tamoxifène, de la protéine recombinase Cre sous la dépendance du promoteur du gène *Plp1* entraîne l'excision d'une cassette d'arrêt de la transcription placée devant le gène codant pour la protéine fluorescente jaune (YFP). Cette réaction est définitive, et rend la cellule dans laquelle elle a eu lieu fluorescente, ainsi que toutes ses descendantes. Grâce à cette technique, une nouvelle voie de migration des mélanoblastes a pu être mise en évidence. En effet, à e10.5 chez la souris *Plp1-Cre^{ERT2} ; Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*, il est possible d'observer le long des axones, des mélanoblastes YFP⁺-dérivées de cellules ayant exprimé *Plp1* se détachant des nerfs (Adameyko *et al.*, 2009) (Figure 1.15). Ces mélanoblastes PCS-dérivés atteignent la peau vers e13 et se retrouvent dans des proportions supérieures ($61 \pm 3.25\%$) aux mélanoblastes directement dérivés des cellules de la crête neurale (Adameyko *et al.*, 2009).

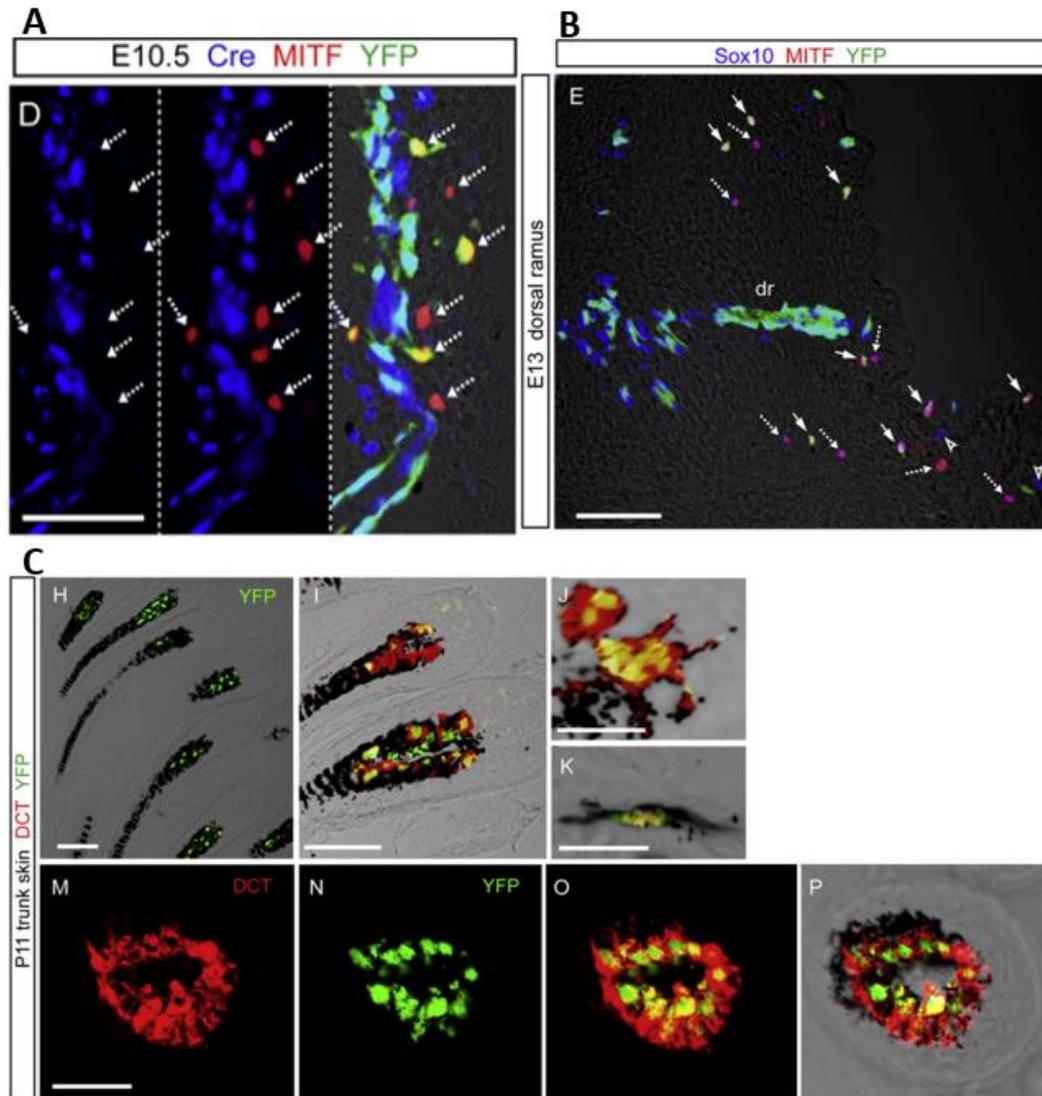


Figure 1.15. Des mélanocytes dérivent de précurseurs de cellule de Schwann ayant exprimé *Plp1*.

(A) à e10.5, des mélanoblastes MITF⁺ et YFP⁺, donc dérivé de PCS, se détachent du nerf. Ils n'expriment alors plus *Plp1*. (B) Ils se retrouvent au niveau de l'épiderme vers e13 ou ils se sont mélangés aux autres mélanocytes de la voie dorsolatérale. (C) Enfin, 11 jours après la naissance (p11), on les retrouve dans une proportion majoritaire au niveau du follicule.

Adapté de (Adameyko *et al.*, 2009)

Autour de e14, les mélanoblastes issus des deux voies de migration prolifèrent au niveau du derme et de l'épiderme, et commencent leur colonisation de la peau et des follicules en développement, où, selon ce modèle, ceux dérivés des PCS représentent respectivement $58.6 \pm 4.1\%$ et $65.9 \pm 3.1\%$ des mélanocytes totaux (Adameyko *et al.*, 2009).

Selon ce modèle, les mélanocytes dérivés des PCS au niveau du tronc colonisent aussi les autres organes dans des proportions variables. Ainsi les mélanocytes DCT+ de l'oreille interne sont à $17.47 \pm 1.784\%$ dérivés de PCS alors que ceux du cœur le sont à $90.11 \pm 0.8285\%$, ceux du cerveau à $16.51 \pm 10.88\%$ et enfin ceux des yeux à $76.02 \pm 3.041\%$ (Figure 1.16) (Kaucka *et al.*, 2021). Il est intéressant de noter la variabilité, en fonction des organes, de la proportion de chacune des origines des populations de mélanocytes. Cela pourrait suggérer que certaines fonctions physiologiques pourraient être spécifiques à une origine plutôt qu'une autre.

Il est toutefois important de prendre en considération que ce système reposant sur une induction au tamoxifène, il n'est pas possible d'être absolument certain de la proportion de mélanocytes dérivant de PCS. En effet, un défaut dans l'induction peut diminuer la quantité observable de mélanoblastes semblant dérivés des PCS. Une solution pour répondre au problème de la proportion de mélanocytes PCS-dérivés est l'utilisation d'un système *Cre-LoxP* constitutif ne nécessitant pas d'induction. Malheureusement, l'utilisation d'un autre modèle pour le traçage des PCS, tel que le modèle constitutif *Dhh-Cre*, n'a pas permis de mettre en évidence cette voie de migration (Figure 1.17), malgré la forte proximité d'expression de *Plp1* et *Dhh* dans les PCS (Jaegle *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2006). Suite à l'impossibilité de valider le fonctionnement de cette voie de migration avec le modèle murin *Dhh-Cre*, il a été fait l'hypothèse d'une potentielle trop faible expression de *Dhh* pour induire l'expression de la protéine recombinase Cre et déclencher l'excision de la séquence encadrée par les motifs *LoxP* (Van Raamsdonk et Deo, 2013).

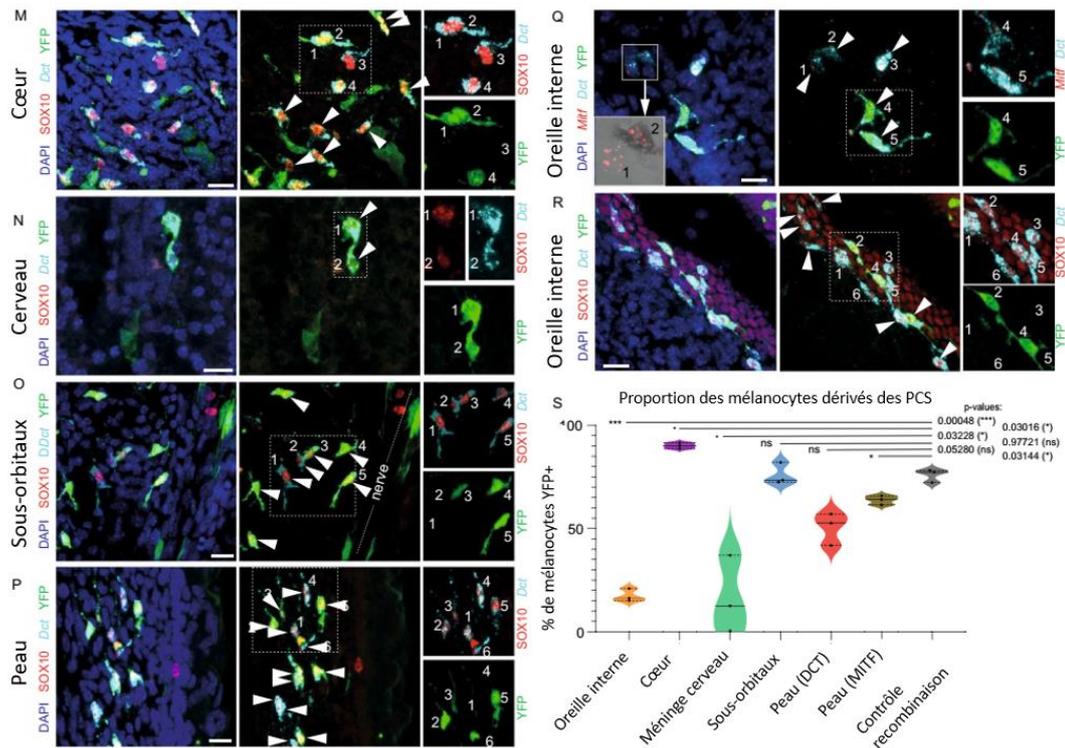


Figure 1.16. Origine des mélanocytes de l'oreille interne, du cœur, du cerveau et de la peau.

Marquages par immunofluorescence (M-R) et quantification (S) des mélanocytes dérivés de précurseurs de cellules de Schwann ayant exprimé *Plp1*, dans différents organes.

Adapté de (Kaucka *et al.*, 2021)

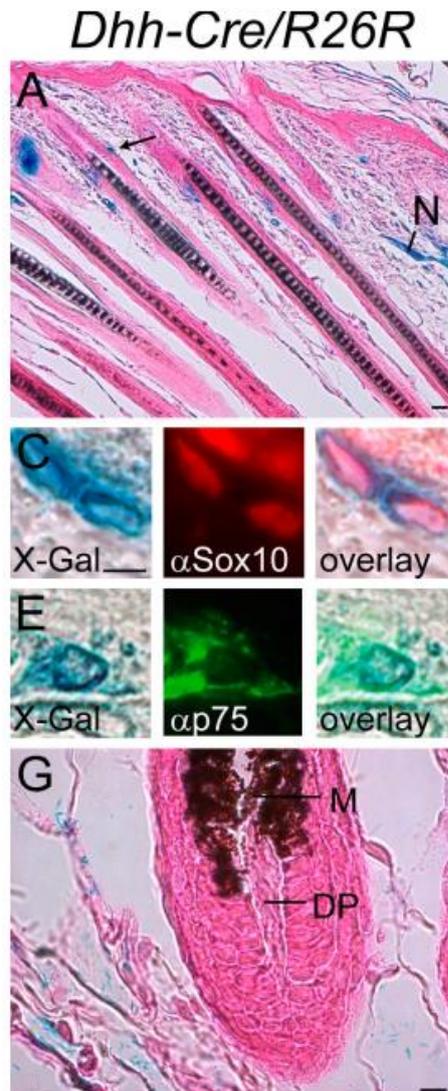


Figure 1.17. Le traçage des mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann.

Marquage par combinaison de souris *Dhh-Cre* et *Rosa26^{X-Gal}*, des cellules dérivées des précurseurs de cellules de Schwann ayant exprimé *Dhh*. Les cellules SOX10+ du bulge sont apparemment dérivés des précurseurs de cellules de Schwann ayant exprimé *Dhh* mais pas les mélanocytes matures.

Adapté de (Wong *et al.*, 2006)

L'étude de cette seconde voie de migration s'est pour le moment surtout focalisée sur la migration des cellules de la crête neurale du tronc, mais des études tendent à montrer que la colonisation de la partie crâniale de l'embryon est un peu différente.

En effet, au niveau du crâne, il a d'abord été montrée une présence importante de mélanoblastes MITF+ à e9.5, à proximité des nerfs facial (VII), vestibulo-cochléaire (VIII), glossopharyngien (IX) et vagal (X) (Adameyko *et al.*, 2012; Kaucka *et al.*, 2021), suggérant qu'une première vague précoce de mélanoblastes dérivés des PCS colonisent la base du crâne (Figures 1.18, 1.19). Plus récemment, il a été mis en avant que la vésicule otique, la structure primitive de l'oreille interne, est alimentée en mélanoblastes dérivés des PCS MITF+ à partir de e10.5 par les nerfs crâniens proches (Figure 1.19), et particulièrement le nerf vestibulo-cochléaire (VIII) (Kaucka *et al.*, 2021). Par la suite, la seconde vague de mélanoblastes dérivés des cellules de la crête neurale, provenant de la partie dorsale de l'embryon et migrant le long de de l'épiderme, s'attelle à la colonisation du reste du crâne à partir de e11.5 (Adameyko *et al.*, 2012).

Cela confirme donc que les cellules de la crête neurale crâniennes alimentent, comme celles du tronc, l'organisme en mélanocyte selon deux voies distinctes, directement dérivés des cellules de la crête neurale ou via un stade de précurseurs de cellules de Schwann. Comme pour le tronc, mélanoblastes dérivés des PCS et dérivés des cellules de la crête neurale migrent dans des temporalités différentes entre eux, mais cela se fait aussi en décalage par rapport aux voies de migration du tronc. Les effets d'une telle différence de temporalité ne sont toutefois pas connus, ni la proportion des mélanoblastes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann et des cellules de la crête neurale colonisant la cochlée et le vestibule dans l'oreille interne.

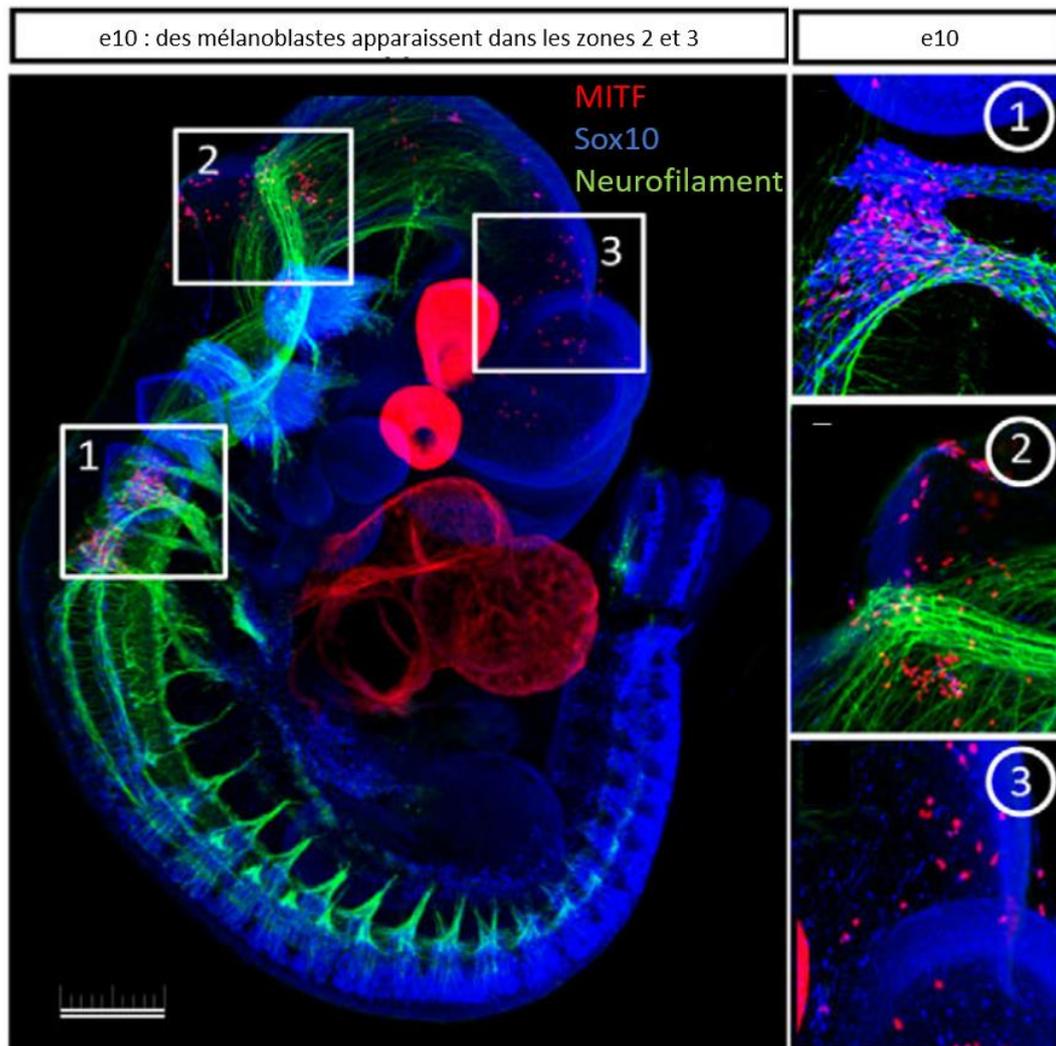


Figure 1.18. Migration crâniale des mélanocytes

À partir de e10, il est possible d'observer des mélanoblastes MITF+ à proximité des nerfs crâniens IX-X (1), dans la région du cerveau moyen et du cerveau postérieur (2) et dans la région faciale antérieure de la tête (3).

Adapté de (Adameyko *et al.*, 2012)

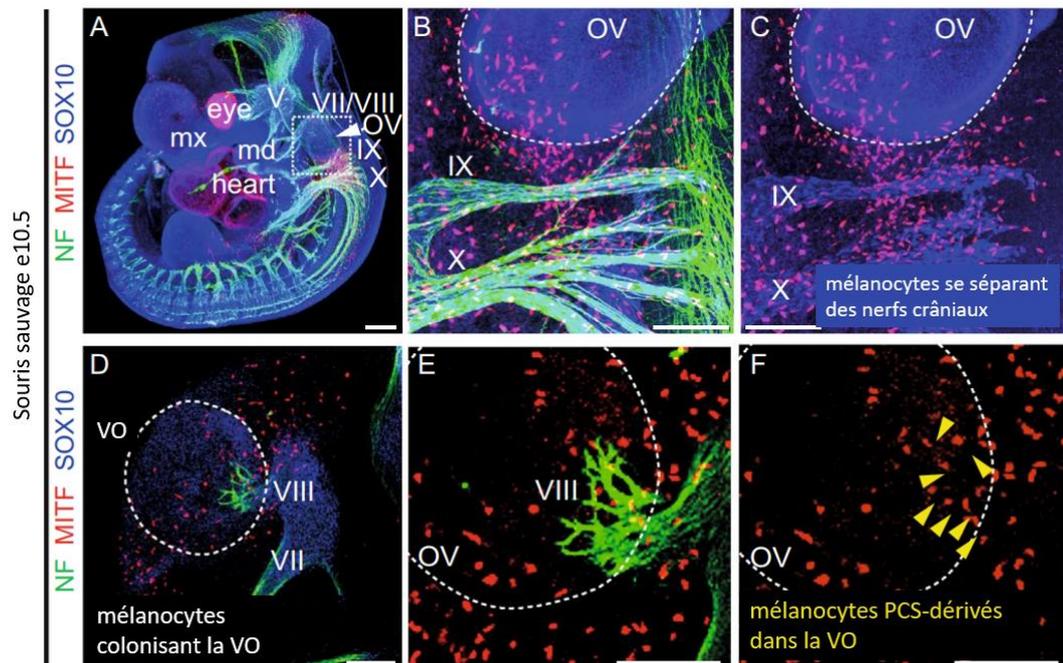


Figure 1.19. Colonisation de la vésicule otique par les mélanocytes.

(A) A e10.5, on peut observer la vésicule otique (VO) en formation. (B, C) Par le dessous, des mélanocytes MITF⁺ semblent se détacher des nerfs glossopharyngien (IX) et vagal (X) alors que (D) le nerf vestibulo-cochléaire (VIII) est lui directement au contact de la VO et (E, F) semble alimenter cette dernière en mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann MITF⁺.

Adapté de (Kaucka *et al.*, 2021)

1.2.4 Processus moléculaires impliqués dans le développement des mélanocytes.

Le développement des mélanocytes est finement contrôlé par différentes voies de signalisation (Figures 1.10, 1.13) (White et Zon, 2008). Très tôt, la voie WNT/ β -CATENINE participe au développement des mélanoblastes (Figure 1.13), et un défaut dans cette dernière entraîne un déficit en mélanocytes (Goding, 2000). A l'inverse, une surexpression de β -CATENINE entraîne une augmentation importante de la population de cellules pigmentaires au détriment des cellules de Schwann (Goding, 2000), soulignant à nouveau la proximité entre ces deux types cellulaires et le rôle important de WNT dans le choix de la destinée cellulaire des cellules de la crête neurale. Cette voie intervient aussi plus tard, lors de la différenciation en mélanocytes matures (Yamada *et al.*, 2013). Parmi les nombreux gènes dont l'expression est régulée par la voie WNT/ β -CATENINE, on trouve *Mitf* (Takeda *et al.*, 2000).

Mitf est un autre gène clé dans le développement et le fonctionnement des mélanocytes (Figures 1.3, 1.10, 1.13). Il est capable de se fixer à différentes séquences de l'ADN et se trouve en amont d'un grand nombre de gènes impliqués dans la synthèse de la mélanine (Aoki et Moro, 2002; Du et Fisher, 2002; Tsujimura *et al.*, 1996; Yasumoto *et al.*, 1994; Yasumoto *et al.*, 1997) (Figure 1.3). Il joue aussi un rôle dans la prolifération des mélanocytes, puisqu'on le trouve à l'origine de certains mélanomes (Levy *et al.*, 2006). L'expression de *Mitf* est contrôlée par SOX10, et le couple MITF-SOX10 peut lui aussi être à l'origine de certains mélanomes (Tudrej *et al.*, 2017). Ce contrôle de l'expression de *Mitf* se fait en synergie avec PAX3, avec lequel SOX10 interagit directement en se fixant sur un région proche de la région de fixation de ce dernier, en amont du gène *Mitf* (Bondurand *et al.*, 2000).

Les protéines SOX, et particulièrement SOX9 et SOX10, jouent, elles aussi, un rôle essentiel dans le développement des mélanocytes (Harris *et al.*, 2010) (Figures 1.10,

1.13). Les deux sont exprimés à des temps très précoces, à la fois dans la voie de développement des mélanocytes (Figure 1.13) et des cellules de Schwann (Figure 1.14). SOX10 est un acteur clé dans le développement des cellules gliales et sa mutation entraîne un défaut de développement des cellules de Schwann (Britsch *et al.*, 2001). Il est exprimé à différents stade de développement des cellules de Schwann et des mélanocytes, mais son rôle dans l'adressage dans l'un ou l'autre de ces destinées cellulaires n'ai en revanche pas encore élucidé. SOX10 est connu pour interagir avec plusieurs voies de signalisation, dont EDNRB lors de la formation du système nerveux entérique et du développement des mélanocytes (Stanchina *et al.*, 2006).

La voie EDN3/EDNRB est en effet elle aussi primordiale pour le développement des mélanocytes (Figures 1.10, 1.13). Entre e10.5 et e12.5, elle est impliquée dans la différenciation, la migration et la prolifération des mélanoblastes (Lahav *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). Un défaut dans cette voie de signalisation peut causer le syndrome de Waardenburg (Issa *et al.*, 2017) qui provoque une altération de la pigmentation. *In vitro*, il est possible de déclencher la prolifération des cellules bipotentes glio-mélanocytiques à partir d'une culture de cellules de la crête neurale *in vitro*, par simple ajout d'EDN3 dans le milieu de culture (Lahav *et al.*, 1998). Une exposition prolongée à l'EDN3 entraîne un arrêt de la prolifération et une différenciation de ces cellules en mélanocytes (Lahav *et al.*, 1996). Il a aussi été montré que *EDNRB* est surexprimé dans une majorité des mélanomes (Lahav *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été mis en évidence une forte diminution du nombre de mélanoblastes crâniens entourant les nerfs facial (VII) et vestibulo-cochléaire (VIII) d'embryons *Ednrb*^{-/-}, ainsi qu'une impossibilité pour les mélanoblastes de se détacher des nerfs glossopharyngien (IX) et vagal (X) (Kaucka *et al.*, 2021). Comme la voie WNT/ β -CATENINE, la voie EDN3/EDNRB semble donc influencer à la fois la prolifération des précurseurs de mélanocytes, mais aussi leur différenciation et l'équilibre entre le destin mélanocyte et Schwann.

Enfin, il a été mis en lumière une augmentation de la quantité de mélanoblastes PCS-dérivés autour des nerfs de mutants *ErbB3^{-/-}*, suggérant ainsi que la voie de signalisation NRG1/ERBB3 pourrait être impliquée dans la régulation à la baisse de la différenciation des PCS en mélanocytes (Adameyko *et al.*, 2009). Toutefois, le processus par lequel les PCS se différencient en mélanocyte n'est pas encore élucidé.

1.2.5 La formation des follicules.

Les follicules pileux sont des structures essentielles pour les mélanocytes, puisque ce sont eux qui stockent les CSM capables d'alimenter le follicule et l'épiderme en mélanocytes matures. Leur formation est un processus finement contrôlé qui débute pendant l'embryogenèse, alors que les mélanoblastes continuent leur prolifération. Elle se déroule en trois phases qui se distinguent par les voies de signalisation cellulaire activées et les modifications morphologiques des différentes structures.

La première phase de formation des follicules est appelée l'induction et consiste en le déclenchement de la cascade de signalisation. Les premiers signaux de formation du follicule apparaissent à e13 par l'activation des voies WNT/B-CATENINE de l'épiderme à partir de signaux générés par les cellules du derme (Atit *et al.*, 2006; Noramly *et al.*, 1999; Olivera-Martinez *et al.*, 2001; Wang et Wu, 2014). Cela entraîne, vers e14, la formation d'une placode, c'est-à-dire une concentration de cellules au niveau de l'épiderme. On y retrouve des mélanocytes, ainsi que des fibroblastes qui s'agrègent pour former la papille cutanée (Driskell *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2020).

C'est alors que débute la seconde phase d'organogénèse. À l'endroit de la placode, il s'opère une invagination de l'épiderme dans le derme, autour de e15. Ce changement est accompagné d'une prolifération importante des cellules de l'épiderme, qui viennent englober une partie de la papille dermique (Schmidt-Ullrich et Paus, 2005).

Enfin à partir d'environ e18 commence la phase de cytodifférenciation qui se poursuit jusqu'à après la naissance. Les cellules de l'épiderme continuent à s'enfoncer dans le derme. Celles qui sont le plus proches de la partie centrale du follicule forment la gaine interne de la racine et stimulent les kératinocytes pour débiter la synthèse du poil. Autour de cette gaine se forme la gaine externe de la racine, dans laquelle se développent la glande sébacée et le bulge (Abe et Tanaka, 2017; Liu *et al.*, 2013). Le follicule pileux acquiert sa structure définitive quelques jours après la naissance, et débute alors son cycle de croissance et destruction (Cotsarelis, 2006).

Tout au long de ce processus développemental, des mélanoblastes et mélanocytes participent à la colonisation du follicule pileux en formation. Il a été mis en lumière trois populations de mélanocytes exprimant KIT durant cette migration. Une première qui stoppe sa progression au niveau du muscle érecteur du poil, et qui forme le bulge, une seconde qui continue jusqu'au bulge, juste au-dessus de la ligne de Auber, qui forme un rassemblement de mélanocytes matures, et enfin une troisième qui vient se positionner tout au fond du follicule, dans la partie de celui-ci qui englobe la papille dermique (Peters *et al.*, 2002). Il a été suggéré que cette dernière population forme la niche et le microenvironnement de progéniteur de mélanocyte pour alimenter la base du poil en mélanocytes matures (Figure 1.5) (Liao *et al.*, 2017).

Le développement des mélanocytes est un processus complexe, gouverné par de nombreux facteurs. Il peut, à chaque étape, être victime de défaut à même d'entraîner des maladies. Évidemment, plus ce défaut arrive tôt dans le processus de développement, plus le risque de perturber d'autres voies est grand. Les neurocristopathies sont des maladies qui touchent les cellules de la crête neurale, et donc, pour certaines d'entre elles, les mélanocytes.

1.3 Les neurocristopathies

Ces maladies, qui surviennent exclusivement chez les vertébrés, sont dues à un défaut de développement des cellules de la crête neurale. Étant donné le caractère multipotent des cellules de la crête neurale, et donc leur implication dans la génération d'un grand nombre de types cellulaires, cette perturbation du développement peut entraîner une grande variété d'anomalies (Pilon, 2021). On retrouve ainsi des neurocristopathies provoquant des défauts des structures osseuses au niveau crâniofacial (Trainor, 2010), des troubles de l'audition (Ritter et Martin, 2019), des dysfonctionnements du tube digestif (Bergeron *et al.*, 2015; Soret *et al.*, 2015), des défauts de pigmentations de la peau et des poils (Bergeron *et al.*, 2015), ou encore certains cancers, tels que les mélanomes (Sinnberg *et al.*, 2018). La prévalence des différentes neurocristopathies est variable, une des plus communes, la neurofibromatose de type 1 touche 1/3000 naissances alors que la microphthalmie avec anomalies des membres touche moins de 1/1 000 000 naissances (orpha.net).

Étant donné le rôle important des cellules de la crête neurale, et la grande variété de types cellulaires qui en dérivent, ces maladies peuvent être associées à des symptômes graves liés à des malformations ou des dysfonctionnements d'organes essentiels composés en partie de dérivés de cellules de la crête neurale. Le syndrome de Waardenburg de type IV fait partie des neurocristopathies à risque s'il n'est pas traité rapidement par chirurgie (Mahmoudi *et al.*, 2013). Il associe maladie de Hirschsprung et Syndrome de Waardenburg.

1.3.1 La maladie de Hirschsprung.

Cette maladie tire son nom du Dr. Harald Hirschsprung, un pédiatre danois du milieu du XIX^{ème} siècle (Sergi, 2015). Son article majeur s'intitule en allemand

« Stuhlträchtigkeit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Côlons » ou « Constipation chez le nouveau-né suite à la dilatation et à l'hypertrophie du côlon ». Il y décrit la prise en charge de deux jeunes enfants qui présentent des symptômes de constipation importante, dû à une forte contraction du côlon distale, entraînant une dilatation de l'intestin. Depuis, la compréhension de cette maladie a fortement évolué, et l'on sait que ce mégacôlon est dû à un manque ou une absence de ganglion du système nerveux entérique dans les plexus sous-muqueux et myentérique (Zhou *et al.*, 2021). Ce réseau neural contrôle la contraction et la relaxation des muscles de la paroi du côlon. C'est le système nerveux entérique qui permet le phénomène de péristaltisme, qui fait progresser le bol alimentaire dans le système digestif. En son absence, la paroi du côlon ne peut se dilater, ce qui entraîne le mégacôlon. Sans traitement, cette occlusion intestinale peut entraîner de graves complications pouvant mener jusqu'au décès. À ce jour, et bien que des thérapies soient en cours de développement (Soret *et al.*, 2020), le seul traitement efficace est la chirurgie consistant à retirer la partie aganglionnaire.

La maladie de Hirschsprung est due à un défaut de colonisation du côlon durant l'embryogenèse par les précurseurs du système nerveux entérique dérivées des cellules de la crête neurale. Cela peut être dû à des modifications de l'expression de différents gènes dont les fonctions varient. Les causes les plus connues sont des perturbations des voies GDNF/RET (Glial cell-derived neurotrophic factor/REarranged during Transfection) (Schuchardt *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 2002) et EDN3/EDNRB (Edery *et al.*, 1996; Hosoda *et al.*, 1994) contrôlant la survie, prolifération et migration des précurseurs du système nerveux entérique dérivés des cellules de la crête neurale. Il existe d'autres mécanismes plus originaux, ainsi il a aussi été montré que la modification de l'expression du gène codant pour l'hélice $\alpha 4$ du collagène IV peut entraîner une surexpression de microfibrilles collagène VI qui perturbe la migration des cellules dérivées des cellules de la crête neurale (Soret *et al.*, 2015).

Chez l'humain, la maladie de Hirschsprung seule n'est pas toujours associée à des défauts de dépigmentation. En effet, certaines neurocristopathies particulières sont caractérisées par une atteinte au développement des mélanocytes, elles sont alors appelées Syndrome de Waardenburg.

1.3.2 Le syndrome de Waardenburg.

C'est en 1947 que Petrus Johannes Waardenburg observe pour la première fois des symptômes qu'il compile dans une publication de 1951 intitulée

A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and noseroot with pigmentary anomalies of the iris and head hair and with congenital deafness; Dystopia canthi medialis et punctorum lacrimalium laterovera, hyperplasia supercillii medialis et radiceis nasi, heterochromia iridum totalis sive partialis, albinismus circumscriptus (leucismus, poliosis) et surditas congenita (surdimutitas) (Waardenburg, 1951)

Il associe trois symptômes à ce nouveau syndrome : des malformations crâniofaciales, des défauts de pigmentations et des troubles de l'audition. L'étude de ce syndrome a depuis permis une classification plus précise en 4 types distincts, selon les symptômes et les gènes impliqués.

1.3.2.1 Le syndrome de Waardenburg de type I.

Le type I est en quelque sorte le syndrome de Waardenburg originel. Il se caractérise par une hypopigmentation de certaines parties de la tête, du visage et de la peau, une surdité neurosensorielle, une hétérochromie et un large écartement entre les deux yeux. Il touche environ 1/40 000 naissances, et est dû entre autres à une mutation sur le gène *PAX3* (Zhang *et al.*, 2021).

1.3.2.2 Le syndrome de Waardenburg de type II.

Le type II se différencie du type I par un écartement normal entre les deux yeux. Le syndrome de Waardenburg de type 2 touche environ 1/40 000 naissances. Il a été classé en 5 sous-types (de A à E) suivant le(s) gène(s) et/ou le chromosome impliqué(s), mais ses causes restent très hétérogènes. On y retrouve des gènes classiquement impliqués dans le développement des mélanocytes, tels que *MITF*, et *SOX10* (Pingault *et al.*, 2010) (Figures 1.10, 1.13).

1.3.2.3 Le syndrome de Waardenburg de type III.

Ce syndrome, aussi appelé syndrome de Klein-Waardenburg, est caractérisé, en plus des symptômes correspondant au type I, par des défauts de développement des membres supérieurs (Klein, 1983). Il est en très grande majorité causé par la mutation du gène *PAX3*.

1.3.2.4 Le syndrome de Waardenburg de type IV.

Dans sa publication de 1981 intitulée :

White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: Possible variant of Waardenburg syndrome (Shah et al., 1981),

le docteur Krishnakumar N.Shah décrit les symptômes de 12 patientes et patients nouveaux nés de cinq familles différentes. Ils présentent une hypopigmentation d'une partie des cheveux, une hétérochromie des yeux et une obstruction intestinale. Après biopsie de la partie obstruée, il conclut que cette dernière est causée par un long segment du côlon atteint par la maladie de Hirschsprung (Shah *et al.*, 1981). La découverte, chez ces patientes et patients, du cumul d'un syndrome de Waardenburg et de la maladie de Hirschsprung, ainsi que la description d'autres cas ensuite, mène à la l'adoption d'une nouvelle dénomination : syndrome de Waardenburg de type IV ou syndrome de Waardenburg-Shah.

Le syndrome de Waardenburg de type IV touche environ 1/1 000 000 naissances et est classé en trois sous-catégories. Le type 4A est dû à une mutation du gène codant pour le récepteur à l'endothéline B. Le type 4B est dû à une mutation sur le gène

codant pour l'endothéline 3. Enfin, le type 4C est dû à une mutation sur le gène codant pour SOX10.

La très faible prévalence de cette maladie rend l'étude du syndrome du Waardenburg de type IV difficile. Par exemple, on ne dénombre que 13 publications décrivant des cas de syndrome de Waardenburg de type IV sur la période 2011-2021 sur Pubmed. Les modèles murins qui ont été générés pour l'étude de cette maladie se basent sur des mutations des gènes connus comme étant impliqués dans cette maladie, tels que *Sox10* ou les gènes de la voie de signalisation EDN3/EDNRB. Or, des données suggèrent que 35% des cas de Waardenburg de type IV ne peuvent pas être expliqués par une mutation d'un de ces gènes (Pingault *et al.*, 2010), allant ainsi contre la classification simple en trois sous-types. D'où la nécessité de générer d'autres modèles pour l'étude de cette maladie. C'est ce qui a été fait dans le laboratoire du professeur Pilon (Pilon, 2016).

1.3.3 Le modèle de souris *Spot*.

La souris *Spot* a été générée à partir d'un crible consistant à insérer de manière aléatoire la gène codant pour l'enzyme tyrosinase dans le génome de souris albinos FVB/N déficientes pour le gène codant pour *Tyr* (Pilon, 2016), permettant ainsi le rétablissement de la voie de synthèse de la mélanine. Lorsqu'intégré dans un locus important pour le développement des cellules de la crête neurale, cette insertion peut provoquer un défaut de colonisation de ces dernières (Figure 1.20). Étant donnée l'origine crête neurale des mélanocytes, c'est l'observation d'un défaut de pigmentation, comme l'apparition de taches, qui donne une indication du potentiel défaut de développement des cellules de la crête neurale. Au niveau de l'ADN des souris *Spot*, il a été montré que le gène *Tyr* s'était inséré sur le chromosome 13 à proximité de la séquence du gène codant pour le membre 1 de la sous-famille 2 des récepteurs nucléaires (*Nr2f1*), et dans la partie codant pour la forme longue du long ARN non codant *A830082K12Rik*. Cela a eu pour effet de modifier du niveau d'expression de ce *Nr2f1* (Bergeron *et al.*, 2016) (Figure 1.20).

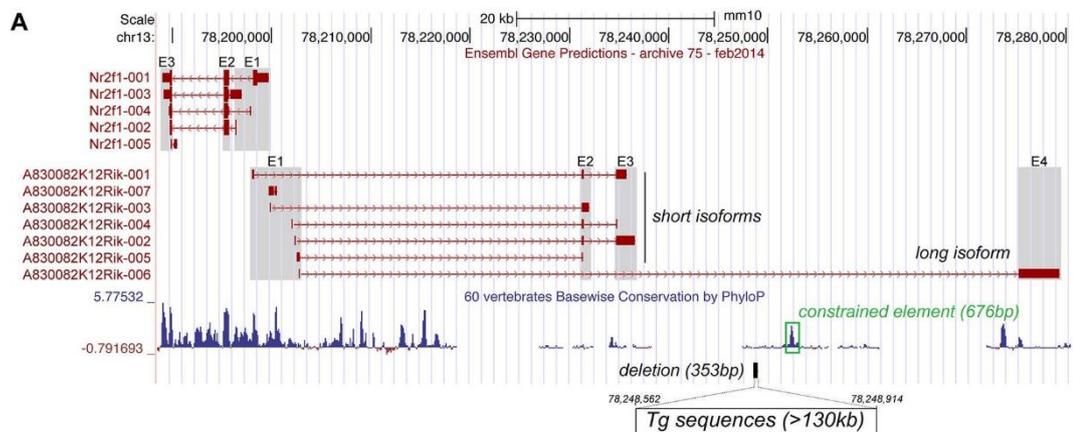
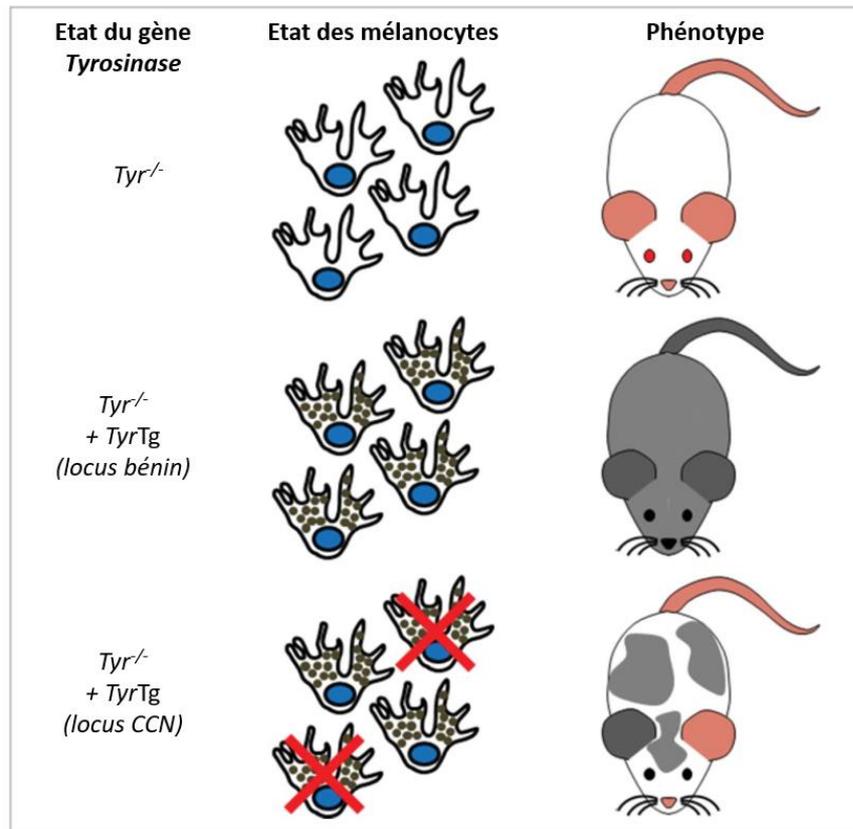


Figure 1.20. Crible génétique pour la génération de modèle murin de neurocristopathie et site d'insertion chez la souris *Spot*.

L'insertion aléatoire d'un gène de *Tyrosinase* dans des souris albinos peut, lorsqu'elle a lieu dans un locus important pour le développement des cellules de la crête neurale, générer des neurocristopathies. Chez la souris *Spot*, ce gène a été inséré sur le chromosome 13 à proximité du gène *Nr2f1* et dans le long ARN non codant *A830082K12Rik*.

Adapté de (Pilon, 2016)

Ainsi, à l'état hétérozygote $Nr2f1^{Spt/+}$, la souris *Spot* présente un pelage majoritairement blanc avec des zones pigmentées, suggérant une perturbation partielle du développement des mélanocytes. Les *Spot* homozygotes $Nr2f1^{Spt/Spt}$ sont en revanche totalement blanches, ce qui suggère un dysfonctionnement important du développement des mélanocytes (Figure 1.21). Ces animaux présentent aussi d'autres symptômes (Bergeron *et al.*, 2016).

Les souris $Nr2f1^{Spt/Spt}$ présentent une mortalité infantile importante, due à une sous-alimentation précoce. C'est le défaut de connexion du nerf spinal I et du nerf hypoglosse XII qui semble entraîner des difficultés de succion et de déglutition.

Les animaux qui survivent à cette sous-alimentation développent un comportement hyperactif de rotation sur eux-mêmes, ce qui suggère un problème au niveau du fonctionnement de l'oreille interne. À la suite de l'analyse de cette dernière, il a été mis en évidence un rétrécissement important du volume de la cavité contenant l'endolymphe au niveau du vestibule. Cela concorde avec l'observation d'une disparition de la pigmentation au niveau du vestibule, suggérant un défaut de présence et/ou de fonctionnement des mélanocytes. La cochlée n'est en revanche pas atteinte, ce qui va dans le sens d'une absence de défaut d'audition chez les souris $Nr2f1^{Spt/Spt}$ (Figure 1.22).

Les souris $Nr2f1^{Spt/Spt}$ présentent par ailleurs un mégacôlon aganglionnaire propre à la maladie de Hirschsprung, qui provoque la mort de ces animaux environ 20 jours après la naissance. L'aganglionose au niveau du système nerveux entérique peut être dû à l'impossibilité des cellules de la crête neurale entériques de coloniser le côlon. En effet, la différenciation anormalement précoce des cellules de la crête neurale entériques en cellules gliales, qui n'ont plus de capacité de migration, empêche la colonisation de la partie la plus distale du côlon. (Figure 1.23) (Bergeron *et al.*, 2016).



Figure 1.21. Pigmentation des mutants *Spot*.

À l'état hétérozygote, les souris *Spot* présentent un rétablissement partiel de la pigmentation. En revanche, les mutants homozygotes perdent la totalité de leur coloration.

Adapté de (Bergeron *et al.*, 2016)

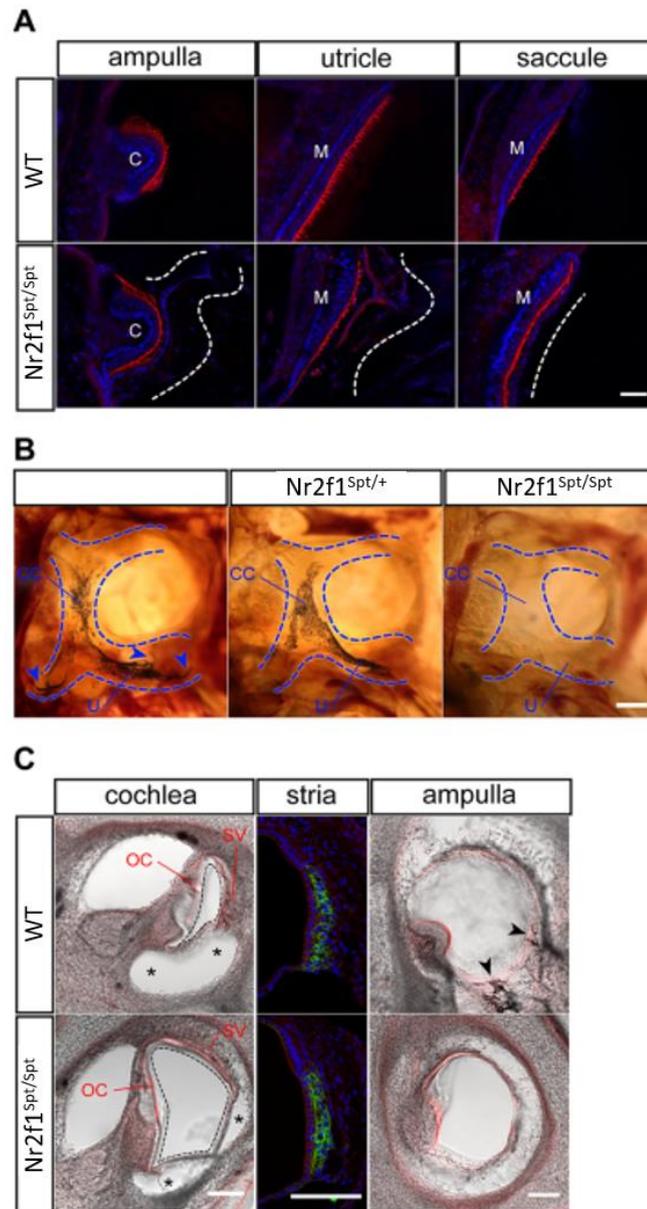


Figure 1.22. Défaut au niveau de l'oreille interne des souris Spot.

(A) Les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}* présentent un effondrement des membranes des différents organes du vestibule, dû à (B) une disparition des mélanocytes de ce dernier dans l'utricle (U) et la croix commune (CC). (C) En revanche, l'organe de Corti (OC) et la strie vasculaire (SV) de la cochlée ne sont pas impactés par ce phénomène, et les mélanocytes (en vert) sont bien présents chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*.

Adapté de (Bergeron *et al.*, 2016)

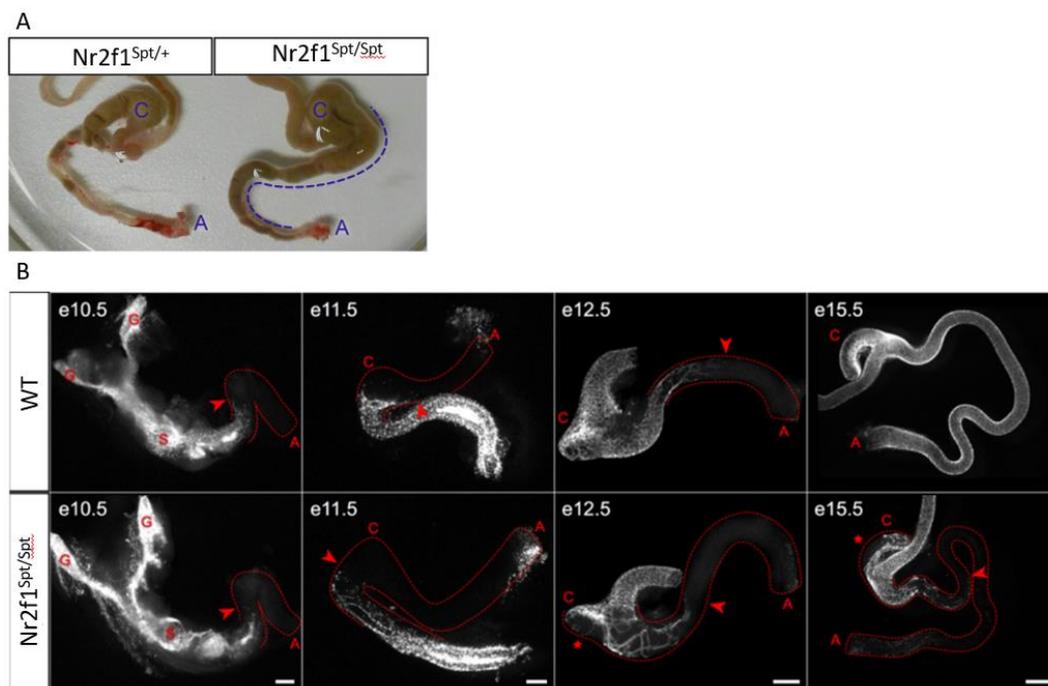


Figure 1.23. Mégacôlon aganglionnaire chez la souris *Spot*.

(A) Les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}* présentent un mégacôlon aganglionnaire qui provoque l'accumulation des matières fécales dans la partie distale du tube digestif. (B) Cela est dû au défaut de colonisation du côlon par les cellules dérivées des cellules de la crête neurale (en blanc).

Adapté de (Bergeron *et al.*, 2016)

Le mécanisme à l'origine des défauts de fonctionnement des mélanocytes de la peau et de l'oreille interne des souris *Spot* n'est pas connu. Toutefois, *Nr2f1*, qui semble jouer un rôle important dans le contrôle de la différenciation des cellules dérivées des cellules de la crête neurale, pourrait être un acteur de ce processus.

1.3.4 Rôle du facteur NR2F1 dans le syndrome de Waardenburg de type IV.

NR2F1 ou COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1), comme il a commencé par être appelé, a d'abord été identifié chez le poulet comme un récepteur nucléaire jouant le rôle de facteur de transcription. Il se fixe à une séquence bien particulière en amont du promoteur du gène codant pour l'ovalbumine (Wang *et al.*, 1987). Dans les années 90, il est étudié chez l'humain où on lui trouve un rôle dans la voie de signalisation des hormones stéroïdiennes (Ritchie *et al.*, 1990), dans celle de l'acide rétinoïque (Tran *et al.*, 1992), dans celle de l'œstrogène (Liu *et al.*, 1993), et bien d'autres. C'est en 2000 qu'apparaît la nomenclature NR2F pour différencier NR2F1 et son paralogue NR2F2 (Métivier *et al.*, 2000). Concernant les cellules gliales, NR2F1 est identifié comme facteur essentiel pour la différenciation des oligodendrocytes du système nerveux central (Naka *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2004). Les oligodendrocytes sont des cellules du système nerveux central responsable de la formation des gaines de myéline autour des axones des neurones de ce dernier. L'atrophie optique de Bosch-Boonstra-Schaaf (BBSOA) est une maladie due à la perturbation de l'expression du gène *NR2F1* (Bertacchi *et al.*, 2019b). Elle se matérialise par de nombreux symptômes dont l'atrophie du nerf optique due à une hypo-myélinisation de ce dernier. Chez la souris dont le gène *Nr2f1* est dysfonctionnel, servant de modèle pour BBSOA, il s'opère une différenciation anormale des oligodendrocytes en faveur des astrocytes (Bertacchi *et al.*, 2019a).

C'est dans le laboratoire du professeur Pilon qu'a pour la première fois été mis en évidence un potentiel rôle de NR2F1 dans le développement du syndrome de Waardenburg de type IV. En effet chez la souris *Spot* homozygote *Nr2f1^{Spt/Spt}*,

l'augmentation de l'expression de *Nr2f1* dans les cellules de la crête neurale entériques, mise en évidence par le tri et le séquençage des ARNm de ces dernières, est accompagnée par une régulation à la hausse de l'expression de *Sox10* et *Ednrb*, deux gènes connus pour être impliqués dans le syndrome de Waardenburg de type IV, aussi celle d'autres gènes pro-gliaux tels que *Fabp7*, *Mpz*, *S100β* ou *Plp1* (Bergeron *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que *Nr2f1* pourrait avoir un rôle dans la différenciation gliale des cellules de la crête neurale entériques (Montemayor *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2004), et que chez *Spot*, c'est la dérégulation à la hausse de son expression qui provoquerait la différenciation précoce des cellules de la crête neurale entériques en cellules gliales entériques.

En revanche, le rôle de *Nr2f1* sur le développement des mélanocytes n'est à ce jour pas connu. Toutefois, son rôle dans la différenciation des oligodendrocytes, des cellules au rôle proche de celui des CS, (Yamaguchi *et al.*, 2004), et son importance dans la différenciation précoce des cellules de la crête neurale entériques en cellules gliales chez *Spot* (Bergeron *et al.*, 2016), ainsi que la proximité entre CS et mélanocytes, observées *in vitro* (Dupin *et al.*, 2000) et dans la voie de migration des mélanocytes passant par un stade de PCS (Adameyko *et al.*, 2009), peut laisser penser qu'il pourrait aussi avoir un rôle dans le développement des CS, et donc potentiellement dans la voie des mélanocytes dérivés des PCS, voir plus largement dans le développement des mélanocytes.

1.4 Hypothèses et objectifs.

Le syndrome de Waardenburg de type IV est une maladie rare, complexe, et relativement peu étudiée. À ce jour, la perte de pigmentation et le défaut de fonctionnement de l'oreille interne que l'on observe chez les patientes et patients atteints de cette maladie ne sont pas bien compris.

Le modèle de souris *Spot* est un outil puissant pour l'étude de ce syndrome. Il a permis de mettre en lumière le rôle de *Nr2f1* dans la formation du mégacôlon aganglionnaire, qui passe par un déclenchement précoce de la différenciation gliale due à une surexpression anormale de *Nr2f1* durant le développement embryonnaire. Pour ce qui concerne les mélanocytes, il a été montré chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}* une absence de pigments dans le pelage et le vestibule, mais un maintien de ces derniers dans la cochlée. La cause du dysfonctionnement des mélanocytes dans la peau et le vestibule n'est à ce jour pas connue ni la raison pour laquelle la cochlée, et donc l'audition, est épargnée par ce phénomène.

Notre première hypothèse est que la peau, la cochlée et le vestibule ne sont pas atteints de la même manière par la mutation *Spot*, car leurs populations respectives de mélanocytes ne sont pas issues des mêmes voies de migration. Notre seconde hypothèse est que la mutation *Spot* agit dans fenêtre temporelle précise, qui porte atteinte aux voies de migration des mélanocytes à destination de la peau et du vestibule, mais pas celle à destination de la cochlée, et que cela est dû à la différence de temporalité dans les différentes voies d'approvisionnement en mélanocytes proviennent des cellules de la crête neurale crâniiales ou du tronc.

CHAPITRE II

DHH-EXPRESSING SCHWANN CELL PRECURSORS CONTRIBUTE TO SKIN AND COCHLEAR MELANOCYTES, BUT NOT TO VESTIBULAR MELANOCYTES

2.1 Résumé

Les mélanocytes sont des dérivés des cellules de la crête neurale. Pendant longtemps, il a été considéré que seules les cellules de la crête neurale migrant du tube neural directement sous la peau en développement pouvaient former des mélanocytes. Cette notion a été remise en question par des études montrant que les précurseurs de cellules de Schwann (SCP) dérivés de la crête neurale et associés aux nerfs périphériques en développement pouvaient également produire des mélanocytes. Cette origine des SCP a été déduite d'études de traçage du lignage cellulaire chez la souris utilisant un transgène comprenant la Cre-recombinase dont l'expression est contrôlée par le promoteur du gène *Plp1* (*Plp1-Cre^{ERT2}*), et un allèle rapporteur fluorescent dans le locus *Rosa26* (*Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*). Cependant, des doutes ont été soulevés, en partie parce que la même expérience en utilisant le promoteur du gène *Dhh* (*Dhh-Cre*) pour la Cre-recombinase n'a pas permis de marquer les mélanocytes lorsqu'il était utilisé avec un allèle rapporteur non fluorescent dans le locus *Rosa26* (*Rosa26^{FloxSTOP-LacZ}*). Cette publication démontre que la même lignée *Dhh-Cre* peut marquer efficacement les mélanoblastes et les mélanocytes lorsqu'elle est utilisée dans un fond génétique FVB/N pur avec l'allèle rapporteur fluorescent plutôt que l'allèle non fluorescent. Nos données suggèrent également que la grande majorité des mélanocytes de la peau sont dérivés de SCP. De manière intéressante, nous avons également découvert que les SCP exprimant

Dhh et *Plp1* contribuent, dans la cochlée, aux mélanocytes de l'oreille interne mais pas dans le vestibule.

2.2 Abstract

Melanocytes are well-known to be derived from neural crest cells. For a long time, only neural crest cells migrating from the neural tube directly under the developing skin were believed to form melanocytes, a notion that was challenged by studies showing that neural crest-derived Schwann cell precursors (SCPs) associated with developing peripheral nerves could also make melanocytes. This SCP origin was inferred from cell lineage tracing studies in mice using a *Plp1* promoter-controlled Cre driver transgene (*Plp1-CreERT2*) and a fluorescent *Rosa26* locus-controlled Cre reporter allele (*Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*). However, some doubts were raised in part because another SCP-directed Cre driver transgene controlled by the *Dhh* promoter (*Dhh-Cre*) was apparently unable to label melanocytes when used with a non-fluorescent *Rosa26* locus-controlled Cre reporter allele (*Rosa26^{FloxSTOP-LacZ}*). Here, we report that the same *Dhh-Cre* driver line can efficiently label melanoblasts and melanocytes when used in a pure FVB/N genetic background together with the fluorescent instead of the non-fluorescent *Rosa26* locus-controlled Cre reporter allele. Our data further suggest that the vast majority of skin melanocytes are SCP-derived. Interestingly, we also discovered that both *Dhh*- and *Plp1*-expressing SCPs contribute inner ear melanocytes in a region-specific manner, extensively contributing to the cochlea but not to the vestibule.

2.3 Significance :

This study validates the concept that an important subset of skin melanocytes are derived from neural crest cells through a Schwann cell precursor intermediate stage.

Our data further allow to extend this concept for inner ear melanocytes located in the cochlea. These findings may thus be of clinical relevance for understanding the pathogenic mechanisms of both pigmentation and hearing disorders.

KEYWORDS: Schwann cell precursors; Dhh; Plp1; Cre/*loxP*; Genetic cell lineage tracing; Skin melanocytes, Inner ear melanocytes; Cochlea; Vestibule; Mouse models.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors thank Denis Flipo (Cellular analyses and Imaging core, CERMO-FC, UQAM) for assistance with confocal imaging. Funding of this work was provided via a grant from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to NP (#RGPIN-2019-07076). GB was also supported by a studentship from the CERMO-FC, whereas NP is a FRQS senior research scholar and the recipient of the UQAM Research Chair on rare genetic diseases.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare no conflict of interest.

The neural crest is a transient, vertebrate-specific cell population of the developing neural tube that generates a wide variety of specialized cell types such as craniofacial chondrocytes, peripheral neurons, peripheral nerve-associated Schwann cells, and melanocytes of the skin and inner ear (Dupin *et al.*, 2018). To generate these diverse cell types, the multipotent neural crest cells emigrate from the dorsal neural tube as a wave that begins in the cranial region of the embryo and that then spreads along the anterior-posterior axis (Szabo et Mayor, 2018), in a coordinated manner with axial elongation and neural tube closure. The differentiation potential of neural crest cells is influenced by their axial origin, on the basis of which four main subpopulations of neural crest cells can be defined (from anterior to posterior): cranial, vagal, trunk and sacral. Although each subpopulation generates its own set of derivatives (Soldatov *et al.*, 2019), all four subpopulations share the ability to form cells of the melanoblast/melanocyte lineage expressing specific markers such as MITF (Microphthalmia-associated

transcription factor), KIT (Mast/stem cell growth factor receptor KIT) and DCT (Dopachrome tautomerase) (Mort *et al.*, 2015).

Analysis of the trunk subpopulation in mouse and chick embryos has revealed the existence of two migration pathways. One known as the “ventral pathway” passes through the somites to give rise to various neural derivatives (*e.g.*, sensory neurons in dorsal root ganglia and Schwann cells along peripheral nerve tracts), while the other one known as the “dorsolateral pathway” runs under the surface ectoderm to specifically give rise to skin melanocytes (Mort *et al.*, 2015; Szabo et Mayor, 2018). This dorsolateral route has long been considered the unique provider of melanocytes, a concept that was challenged over the past decade by experimental evidences in chick and mouse suggesting another neural crest contribution by ventrally migrating Schwann cell precursors (SCPs) (Adameyko *et al.*, 2009; Adameyko *et al.*, 2012; Nitzan *et al.*, 2013).

An SCP origin of melanocytes was deduced from cell lineage tracing studies in mice (Adameyko *et al.*, 2009; Adameyko *et al.*, 2012), which were based on a single genetic system involving the tamoxifen inducible Cre driver *Plp1-Cre^{ERT2}* (Leone *et al.*, 2003) and the fluorescent Cre reporter *Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* (Srinivas *et al.*, 2001). These studies showed that a single tamoxifen dose at embryonic day (e)11.0 was sufficient to yield YFP-positive (*i.e.*, derived from *Plp1*-expressing cells) melanoblasts/melanocytes in the trunk (Adameyko *et al.*, 2009), whereas an earlier pulse at e9.5 yielded YFP-positive melanoblasts/melanocytes in the head (Adameyko *et al.*, 2012). Yet, some doubts about the specificity of the *Plp1-Cre^{ERT2}* tool for the SCP lineage were then raised following studies that reported wider Cre protein expression in non-SCP-fated neural crest cells at e9.5 (Hari *et al.*, 2012), and specific *Plp1* gene expression in e15.5 melanoblasts recovered by FACS (fluorescence-activated cell sorting) from the skin of *Tyr-Cre;Z/EG* double transgenic embryos (Colombo *et al.*, 2012).

The above controversy was also apparently fueled by the apparent inefficiency of the alternative Cre driver *Dhh-Cre* to label SCP-derived melanoblasts/melanocytes (Hari *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2006), although none of these previous studies unambiguously showed that *Dhh*-expressing SCPs are not capable of generating melanocytes. The *Dhh-Cre* driver is believed to faithfully replicate endogenous *Dhh* expression in developing Schwann, Sertoli and endothelial cell lineages (Bitgood et McMahon, 1995; Jaegle *et al.*, 2003; Parmantier *et al.*, 1999a). In developing Schwann cells, the *Dhh-Cre* transgene is supposedly active from e11.5 to postube neuralatal day (P) 10 (Bitgood et McMahon, 1995; Jaegle *et al.*, 2003; Parmantier *et al.*, 1999a; Sharghi-Namini *et al.*, 2006), and this Cre driver has notably proved useful for demonstrating the SCP origin of a subset of enteric neurons (Soret *et al.*, 2020; Uesaka *et al.*, 2015). The apparent discrepancy in melanocyte-labeling capacity between *Plp1-Cre^{ERT2}* and *Dhh-Cre* should thus be interpreted with caution. Although such difference might potentially be explained by the existence of different subpopulations of SCPs, as suggested from studies about the SCP contribution to skeleton formation (Xie *et al.*, 2019), it might also simply be due to experimental differences. Notably, previous studies that directly verified the existence of SCP-derived melanoblasts/melanocytes with *Dhh-Cre* at prenatal (Hari *et al.*, 2012) and postube neuralatal (Wong *et al.*, 2006) stages were both performed using the Cre reporter *Rosa26^{FloxSTOP-LacZ}* and enzymatic detection of β -Galactosidase activity (Soriano, 1999) instead of the Cre reporter *Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* and presumably more sensitive detection of YFP fluorescence (Srinivas *et al.*, 2001). In postube neuralatal *Dhh-Cre; Rosa26^{FloxSTOP-LacZ}* mice, a weak staining reaction would be a plausible explanation for the apparent contradictory findings that β -Galactosidase activity was detected in unpigmented SOX10/p75-positive cells from the bulge region of hair follicles (consistent with a melanocyte stem cell identity), but not in darkly pigmented mature melanocytes from the bulb region (Wong *et al.*, 2006). Moreover, in both of these previous studies (from the same group) the *Dhh-Cre* driver was apparently used in a mixed genetic background of undefined nature (as deduced from the presence of

pigmented melanocytes in Wong et al., 2006) instead of the albino FVB/N genetic background of origin for this line (Jaegle *et al.*, 2003). Switching FVB/N to a mixed genetic background might have caused inaccurate expression of the *Dhh-Cre* driver and thereby erroneous cell lineage tracing, as previously reported for a *Cdx2* enhancer-driven Cre transgene (Coutaud et Pilon, 2013). The FVB/N genetic background also offers the advantage of facilitating marker analyses in mature melanocytes by preventing interference from dark melamine pigments, which are absent in this albino background.

In the course of studies aimed at determining the origin of inner ear melanocytes, we decided to re-evaluate the potential of *Dhh*-expressing SCPs to generate melanocytes, but now using the same fluorescent Cre reporter (*Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*) previously used to analyze the contribution of *Plp1*-expressing SCPs. This interest for inner ear melanocytes was motivated by our prior work with the *Spot* mouse model of Waardenburg syndrome type 4, which suggested that melanocytes from the cochlear and vestibular compartments of the inner ear might have distinct origins (Bergeron *et al.*, 2016).

All mice used in the current study were maintained in the albino FVB/N genetic background (after backcrossing for at least 5 generations when mice had a different background of origin). The *Dhh-Cre* Jax stock #012929; *FVB(Cg)-Tg(Dhh-cre)1Mejr/J* (Jaegle *et al.*, 2003) and *Plp1-Cre^{ERT}* Jax stock #005975; *B6.Cg-Tg(Plp1-cre/ERT)3Pop/J* (Doerflinger *et al.*, 2003) lines were purchased from The Jackson Laboratory, whereas the *Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* line *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}* (Srinivas *et al.*, 2001) was directly provided by Dr. Frank Costantini (Columbia University). All manipulations were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care as approved by the *Comité institutionnel de protection des animaux* (CIPA reference #899) of Université du Québec à Montréal.

Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP} double transgenic mice were first evaluated for the presence of YFP-positive and Cre-negative melanocytes in 1cm² pieces of skin from the back and belly at postnatal day (P)12 (*i.e.*, during anagen phase of the hair cycle). Sciatic nerves were also used as positive control for Cre expression. Some of the freshly-dissected pieces of skin were immediately used to directly analyze emission of YFP fluorescence (after further manual trimming to allow transversal imaging), whereas sciatic nerves and all other pieces of skin were processed for immunofluorescence as previously described (Bergeron *et al.*, 2015). To this end, skin and sciatic nerve samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 4h on ice and washed 3 x 5 min in PBS. For sectioning, skin samples were further incubated overnight in 30% sucrose, embedded in OCT and cut at 20µm with a Leica CM1950 cryostat. Skin sections and whole sciatic nerves were then immunolabeled using standard blocking/washing/diluting solution (10% fetal bovine serum and 0.1% Triton X-100 in PBS). Primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-DCT (Abcam # AB74073; diluted 1:200), goat polyclonal anti-GFP/YFP (Abcam #AB6673; diluted 1:200), and mouse monoclonal anti-Cre (Sigma #Mab3120; diluted 1:500). Corresponding secondary antibodies were Alexa Fluor® 647 AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch # 711-605-152; diluted 1:500), Alexa Fluor® 488 AffiniPure bovine anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch # 805-545-180; diluted 1:500), and Alexa Fluor® 594 AffiniPure donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch # 715-585-151; diluted 1:500). All images were acquired with either a 20X (Plan Fluor 20x/0.75 Mimm) or a 60X (Plan Apo VC 60x1.40 oil) objective on a Nikon A1R confocal microscope.

Remarkably, analysis of immunolabeled pieces of P12 back and belly skin (Fig. 2.1A) revealed the presence of multiple YFP-DCT double-positive melanocytes (*i.e.*, SCP-derived) in both hair follicles (Fig. 2.1B-D) and epidermis (Fig. 2.1E). In hair follicles, YFP-DCT double-positive melanocytes were observed in both bulb and bulge compartments (Fig. 2.1C-D), where mature melanocytes and melanocyte

stem cells reside, respectively. None of these YFP-DCT double-positive melanocytes stained positive for Cre (Fig. 2.1F-G), which was instead detected in YFP-positive but DCT-negative cells such as Schwann cells associated with cutaneous (Fig. 2.1F inset) or sciatic (Fig. 2.1H) nerves. About 85% of hair follicles were found to contain YFP-positive melanocytes, a proportion that remained virtually identical in both back and belly regions (Fig. 2.1I). The average proportion of YFP-positive melanocytes per follicle was similar to the proportion of YFP-positive melanocytes in the epidermis (Fig. 2.1J), which were in both cases similar to the proportion of hair follicles containing YFP-positive melanocytes (Fig. 2.1I). These proportions of 85-90% are higher than the proportions of about 60-65% previously reported with the *Plp1-Cre^{ERT2}* driver upon exposure to a single pulse of tamoxifen (Adameyko *et al.*, 2009). This difference is most likely due to the constitutively active nature of the Cre recombinase in the *Dhh-Cre* model, thereby suggesting that results with this Cre driver are probably more representative of the true extent of SCP contribution. Importantly, these results are not due to unspecific staining by the GFP/YFP antibody as we observed the same expression pattern when emission of YFP fluorescence was directly visualized in samples of unfixed skin (Fig. 2.4K).

To confirm the embryonic origin of skin melanocytes derived from *Dhh*-expressing SCPs, we analyzed their distribution in the trunk at e13.5. *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* double transgenic embryos were generated by natural mating, with noon of the day of vaginal plug detection being designated as e0.5. Cryosectioning, immunolabeling and imaging were performed as described above for postube neuralatal skin, now focusing on transverse sections at forelimb level and also including a marker for peripheral nerves (mouse monoclonal anti- β III-Tubulin; Abcam # AB78078; diluted 1:500).

In total agreement with our findings in the postube neuralatal skin, we detected several YFP-DCT double-positive melanoblasts around the developing ventral

ramus of β III-Tubulin⁺ peripheral nerves (Fig.2.2A). Once again, none of these SCP-derived melanoblasts was found to express Cre (Fig.2.2B). As expected, we also did not detect YFP expression in melanoblasts under the dorsolateral surface ectoderm that are presumably derived from the neural crest without passing through a SCP state (Fig.2.2C). In the wider dorsal region, YFP expression was instead exclusively confined to DCT-negative cells, which may include SCPs (as those associated with the boundary caps of both dorsal and ventral roots of spinal nerves) and endothelial cells that are both known to express *Dhh* at this developmental stage (Bitgood et McMahon, 1995; Jaegle *et al.*, 2003). Together with our observations in P12 skin, these results in e13.5 embryos thus validate the notion that a majority of postube neuralatal melanocytes is derived from the neural crest through an intermediary SCP state.

Having validated that SCP-derived melanocytes could be permanently labeled with YFP fluorescence in *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* mice, we then used this model to analyze the potentially distinct origin of cochlear and vestibular melanocytes (Bergeron *et al.*, 2016). For further validation, we also used *Plp1-Cre^{ERT};Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* mice that were exposed to a single pulse of tamoxifen at e9.5 (via oral gavage of pregnant dams with 50 mg/kg tamoxifen and 2.5mg progesterone diluted in corn oil), a time point that was previously reported to allow tracing of melanoblasts derived from *Plp1*-expressing SCPs in the vicinity of the developing ear (Adameyko *et al.*, 2012). In both cases, inner ears were microdissected from P12 double transgenic mice, fixed in 4% PFA at 4°C overnight and demineralized in 0.5M EDTA (in PBS) during 5 days before being sectioned at 200 μ m with a vibrating blade microtome (Microm HM 650V, ThermoFisher). These sections were immunolabeled as described above for skin and embryo cross-sections, with the difference that melanocytes and YFP were now labeled using goat polyclonal anti-KIT (R&D Systems # AF1356; diluted 1:50) and rabbit polyclonal anti-GFP/YFP (Abcam #AB290; diluted 1:100), respectively. Corresponding secondary antibodies were Alexa Fluor® 647 AffiniPure bovine anti-goat IgG

(Jackson Immunoresearch # 805-605-18-0; diluted 1:500) and Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (Abcam # AB150073; diluted 1:500).

In line with our prior observations made with *Spot* mice (which are specifically lacking vestibular but not cochlear melanocytes (Bergeron *et al.*, 2016)), both *Dhh-Cre* and *Plp1-Cre^{ERT}* drivers were found to label melanocytes from P12 inner ears in a region-specific manner (Fig.2.3). In contrast to the *crus commune* (vestibule), where none of KIT-positive melanocytes were found to be YFP-positive (Fig.2.3A), the large majority of KIT-positive melanocytes from the *stria vascularis* (cochlea) were found to also express YFP (Fig.2.3B), reaching a proportion of about 90% in *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* inner ears (Fig.2.3C). Importantly, Cre expression from the *Dhh-Cre* transgene was only detected in nearby KIT-negative endothelial cells that make up small vessels and not in KIT-positive melanocytes, again validating the specificity of the system. These observations are thus in total agreement with the notion that cochlear and vestibular melanocytes come from two different pathways, with cochlear melanocytes mainly derived from SCPs and vestibular melanocytes derived from non-SCP-fated neural crest cells. This finding helps to explain the vestibule-restricted lack of melanocytes and the accompanying endolymphatic collapse that specifically leads to balance problems (without hearing loss) in the *Spot* mouse model of Waardenburg syndrome type 4 (Bergeron *et al.*, 2016). SCP-derived cochlear melanocytes are most likely coming from the cochleovestibular nerve, for which both the neuronal and glial compartments have been reported to invade the developing inner ear as early as at the e10.5 stage (Sandell *et al.*, 2014).

Overall, this study should help to resolve a long-standing controversy and instill confidence about the SCP origin of a majority of melanocytes, in both the skin and cochlea. Such knowledge should thus seriously be taken into consideration when analyzing the pathogenic mechanisms of pigmentation and inner ear anomalies. One especially interesting open question is whether the dorsolateral and ventral

pathways are mutually influencing each other, in both health and disease states. Studies for addressing this clinically-relevant question will clearly be facilitated by current availability of a wide collection of spontaneous and genetically-engineered mouse models of pigmentation and/or inner ear disorders (Nakamura *et al.*, 2002; Pilon, 2016; Tachibana *et al.*, 2003).

2.4 Figures

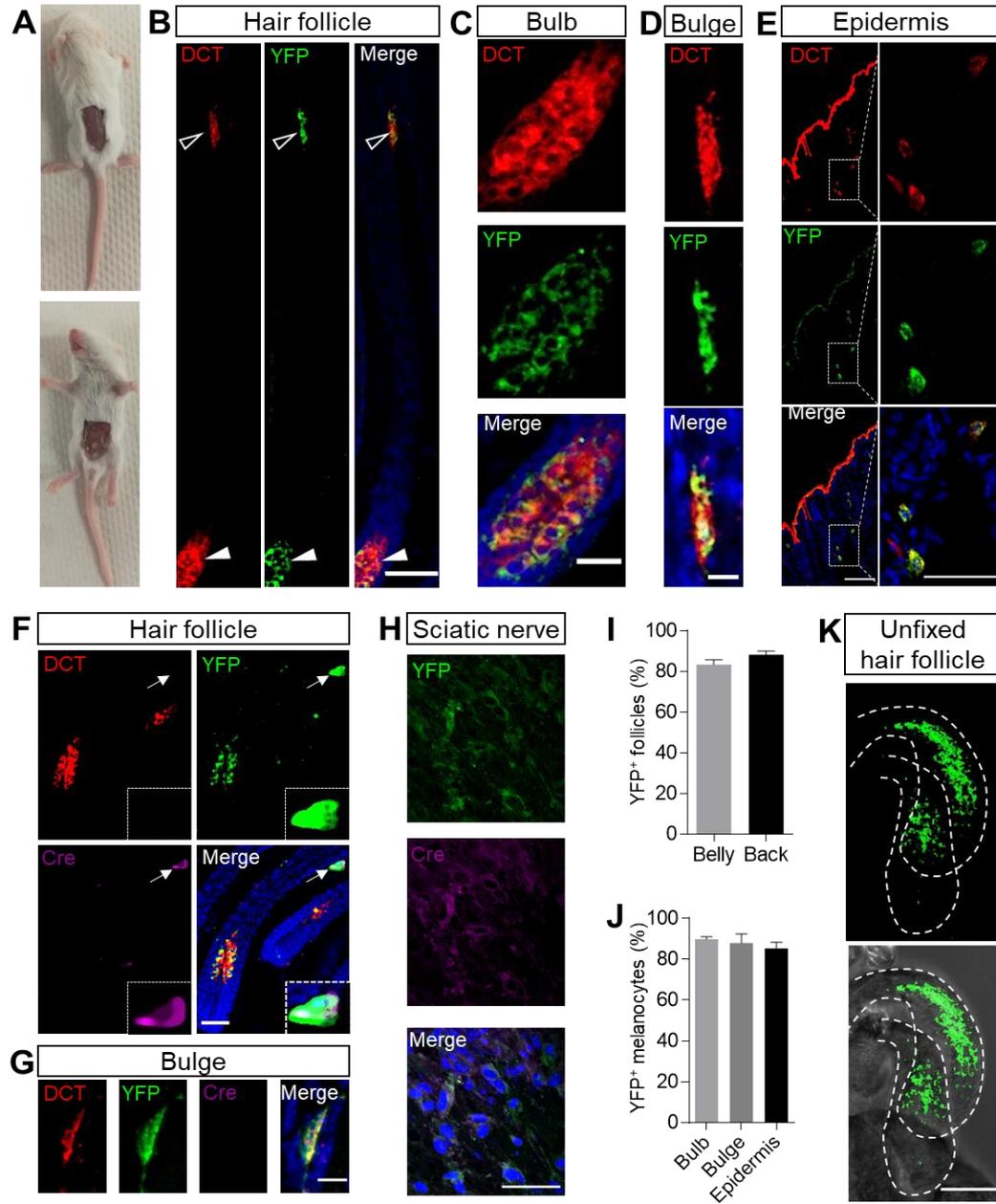


Figure 2.1. Postube neuralatal distribution of melanocytes derived from *Dhh*-expressing SCPs in the skin.

(A) Pictures of P12 *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* double transgenic mice showing where pieces of back and belly skin were dissected. (B-H) Representative confocal microscopy images of 20 μ m transverse skin sections (B-G) or whole sciatic nerve (H) immunolabeled with antibodies against DCT, YFP and/or Cre, and

counterstained with DAPI (blue). DCT-YFP double-positive melanocytes are detected in both the bulb (filled arrowhead in B; zoom-in view in C) and bulge (empty arrowhead in B; zoom-in view in D) compartments of hair follicles, as well as in the epidermis (E). DCT-YFP double-positive melanocytes do not express Cre, which can nonetheless be detected together with YFP in cutaneous (arrow in F; zoom-in view in inset) and sciatic (H) nerve-associated Schwann cells. (I) Proportion of follicles containing YFP-positive melanocytes in back ($88.2\% \pm 1.8\%$; $n = 388$ follicles from 5 animals) and belly ($83.4\% \pm 2.4\%$; $n = 180$ follicles from 5 animals) skin. (J) Proportion of YFP-positive melanocytes in epidermis ($85.3\% \pm 3.0\%$; $n = 176$ DCT-positive epidermal cells from 5 animals), and both bulb ($89.8\% \pm 1.1\%$; $n = 48$ bulbs from 5 animals) and bulge ($87.8\% \pm 4.5\%$; $n = 15$ bulges from 5 animals) compartments of positive hair follicles. (K) Representative confocal microscopy image of direct YFP emission in a piece of unfixed segment of skin of the dorsal region along the transversal plane. Scale bar, $50\mu\text{m}$ (B, E right, H, K), $20\mu\text{m}$ (C, D), $100\mu\text{m}$ (E left, F) (B-D), and $10\mu\text{m}$ (G).

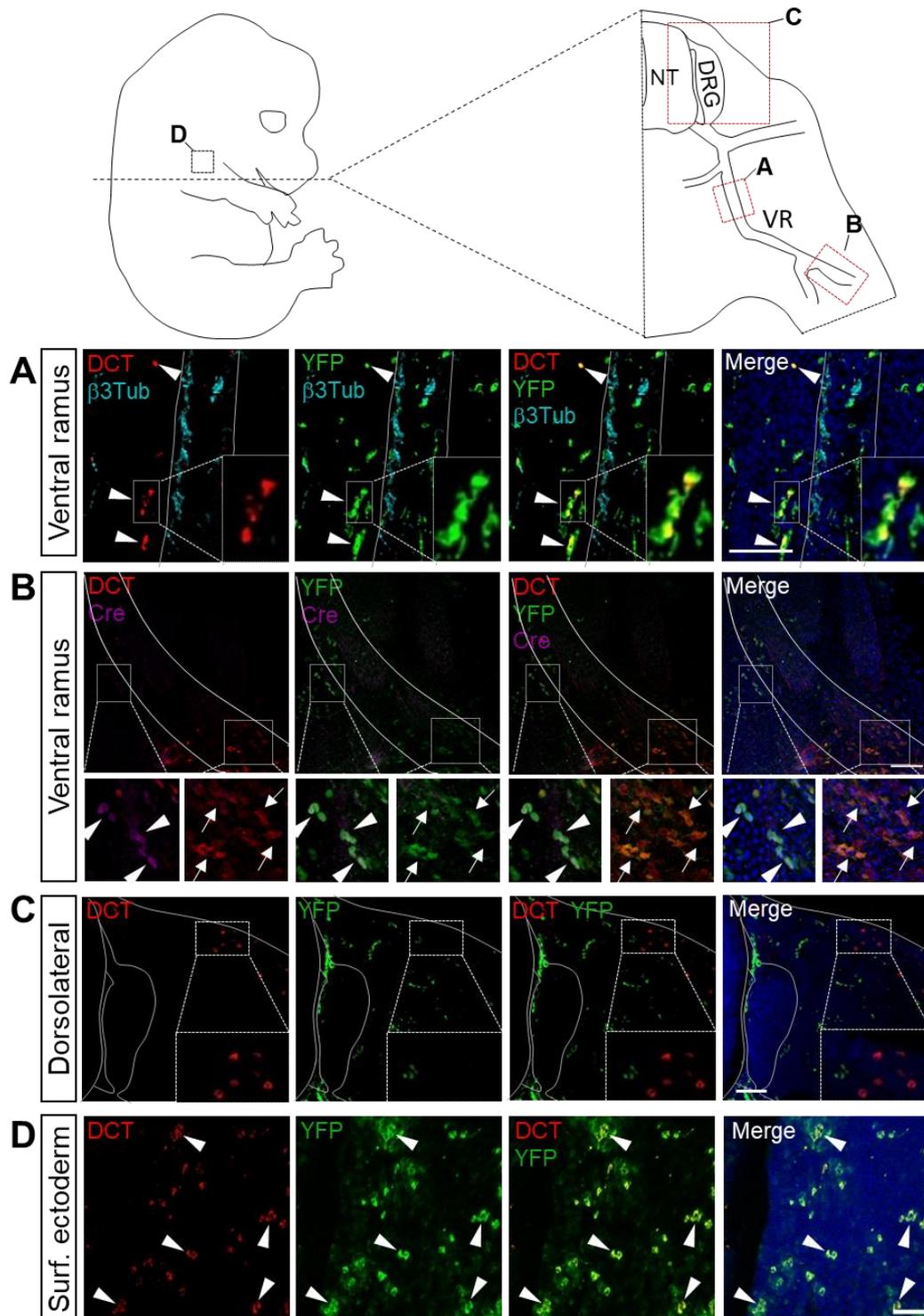


Figure 2.2. Prenatal distribution of melanoblasts derived from *Dhh*-expressing SCPs at e13.5.

(A-D) Representative confocal microscopy images of 20 μ m transverse sections (A-C) or whole embryos (D), taken from regions indicated in the schematic representation at the top ($n \geq 5$ for each region; NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; VR, ventral ramus). Tissues were immunolabeled with antibodies against DCT, YFP and either β III-Tubulin or Cre, and counterstained with DAPI (blue). DCT-YFP double-positive melanoblasts (arrowheads) are detected in the vicinity of β III-Tubulin-positive ventral ramus (A, B; zoom-in views in inset) and in the developing epidermis (D). DCT-YFP double-positive melanoblasts do not express Cre, which can nonetheless be detected in ventral ramus-associated SCPs (arrow in B inset). Dorsolaterally located DCT-positive melanoblasts do not express YFP (C; zoom-in view in inset). Solid outlines delineate dorsal ramus (A, B) or neural tube, dorsal/ventral boundary caps, dorsal root ganglion and surface ectoderm (C). Scale bar, 100 μ m (A, B, D), and 50 μ m (C).

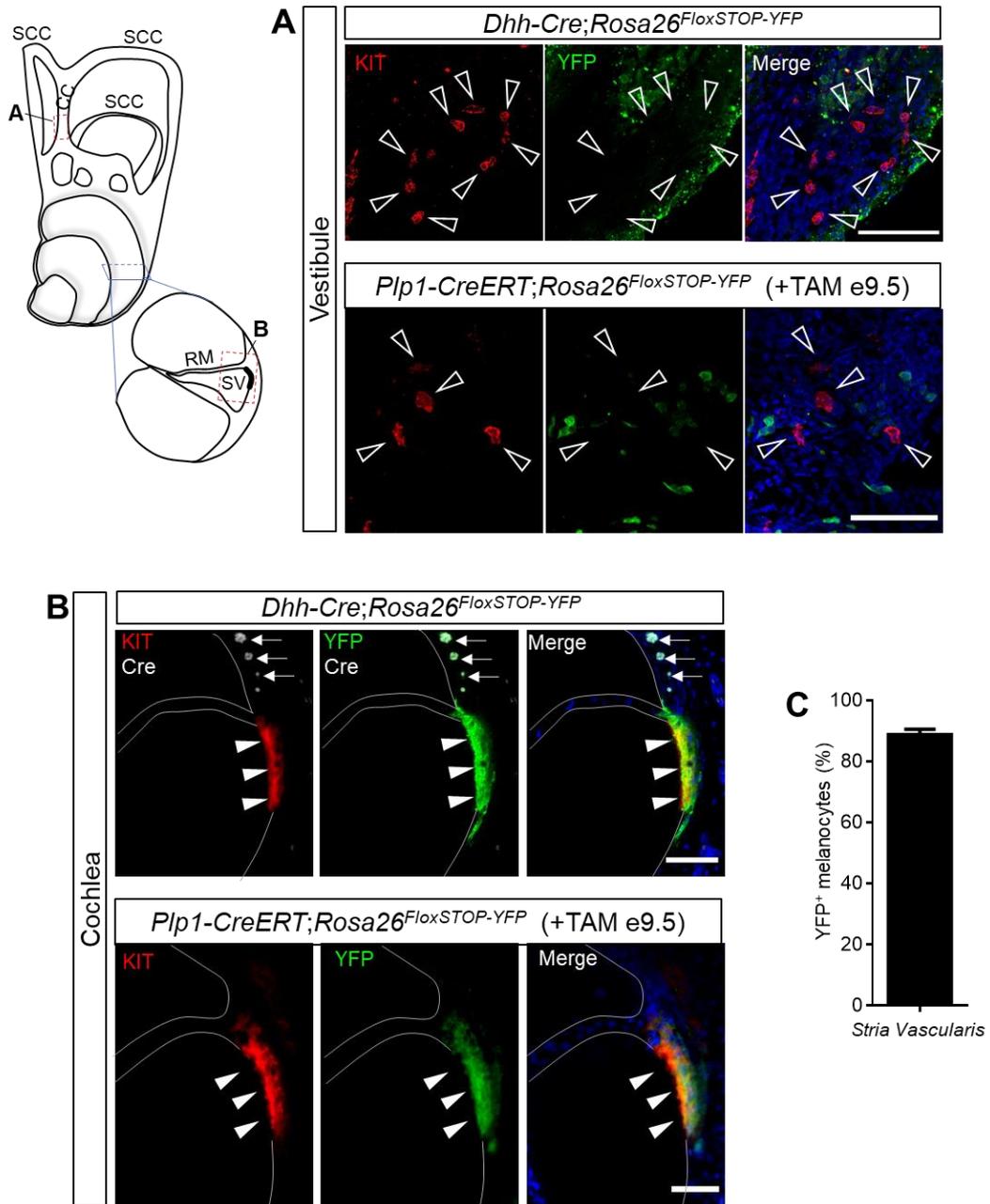


Figure 2.3. Postnatal neural crest distribution of melanocytes derived from *Dhh*- and *Plp1*-expressing SCPs in the inner ear.

(A-B) Representative confocal microscopy images of 200 μ m sections of P12 inner ears, taken from regions indicated in the schematic representation on the left ($n = 6$ for each region; SCC, semi-circular canal; CC, crus commune; RM, Reissner's membrane; SV, stria vascularis). Tissues were immunolabeled with antibodies

against KIT, YFP and/or Cre, and counterstained with DAPI (blue). In both *Dhh-Cre;Rosa^{26FloxSTOP-YFP}* and *Plp1-Cre^{ERT};Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* (exposed to a single dose of tamoxifen at e9.5) mice, KIT-positive melanocytes express YFP in the stria vascularis (filled arrowheads in B) but not in the crus commune (empty arrowheads in A). KIT-YFP double-positive melanocytes from *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* mice do not express Cre, which can nonetheless be detected in endothelial cells (arrows in B). (C) Proportion of YFP-positive melanocytes in the stria vascularis of *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* mice ($88.8\% \pm 4.0\%$; n = 265 KIT-positive cells from 6 animals). Solid outlines in B delineate Reissner's membrane and associated cavities. Scale bar, 100 μ m.

CHAPITRE III

NR2F1 REGULATES A SCHWANN CELL PRECURSOR-VS-MELANOCYTE CELL FATE SWITCH IN A MOUSE MODEL OF WAARDENBURG SYNDROME TYPE IV

Grégoire Bonnamour^{1,2,‡}, Baptiste Charrier^{1,2,‡}, Sephora Sallis^{1,2}, Elizabeth Leduc^{1,2}
and Nicolas Pilon^{1,2,3,*}

¹ Molecular Genetics of Development Laboratory, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal H3C 3P8, Québec, Canada.

² Centre d'excellence en recherche sur les maladies orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal H2X 3Y7, Québec, Canada.

³ Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal H3T 1C5, Québec, Canada.

‡ These authors contributed equally to this work

3.1 Résumé

Le syndrome de Waardenburg (WS) est une maladie génétique rare combinant des défauts de pigmentation et un dysfonctionnement de l'oreille interne du à un développement anormal des mélanocytes dérivés des cellules de la crête neurale (CCN). Dans le cas du WS de type 4 (WS4), ces anomalies sont en outre combinées à une formation anormale du système nerveux entérique dérivé des cellules de crête neurale, ce qui entraîne un mégacôlon aganglionnaire. Le spectre complet des symptômes du phénotype WS4 est présent dans notre lignée de souris *Spot*, dans

laquelle une mutation insertionnelle proche d'un élément *silencer* conduit à une régulation à la hausse de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription Nr2f1, spécifiquement chez les cellules de crête neurale. Des études antérieures ont révélé que le mégacôlon aganglionnaire chez les souris *Spot* est dû à la différenciation prématurée induite par NR2F1 des progéniteurs neuraux entériques en cellules gliales entérique. De manière intéressante, ces travaux ont également montré que le dysfonctionnement de l'oreille interne chez les mutants *Spot* affecte spécifiquement l'équilibre mais pas l'audition, ce qui est cohérent avec l'absence de mélanocytes dérivés du cellules de crête neurale dans le vestibule uniquement. Nous rapportons ici une analyse approfondie de l'effet de la régulation à la hausse de l'expression de *Nr2f1* sur le développement des mélanocytes de l'oreille interne et de la peau, en prenant également en considération leur origine par rapport aux voies de migration dorsolatérale et ventrale des cellules de crête neurale. Dans le tronc, nous avons constaté que la surabondance de NR2F1 dans les cellules de crête neurale de *Spot* force les mélanoblastes migrant dorsolatéralement à adopter anormalement un destin de précurseur de cellule de Schwann (PCS), et inversement empêche les PCS migrant ventralement d'adopter normalement un destin de mélanoblaste. Dans la région crânienne, la régulation à la hausse de *Nr2f1* semble être spécifiquement retardée dans les PCS *Spot*, permettant ainsi aux mélanocytes dérivés des PCS de coloniser normalement la cochlée alors que les mélanocytes non dérivés des PCS ne peuvent atteindre le vestibule. Collectivement, ces données indiquent un rôle clé pour NR2F1 dans le contrôle du choix du destin des SCP/mélanocytes et dévoilent un nouveau mécanisme pathogène pour WS4.

3.2 Abstract

Waardenburg syndrome type 4 (WS4) combines abnormal development of neural crest cell (NCC)-derived melanocytes (causing depigmentation and inner ear dysfunction) and enteric nervous system (causing aganglionic megacolon). The full spectrum of WS4 phenotype is present in *Spot* mice, in which an insertional

mutation close to a silencer element leads to NCC-specific upregulation of the transcription factor-coding gene *Nr2f1*. These mice were previously found to develop aganglionic megacolon because of NR2F1-induced premature differentiation of enteric neural progenitors into enteric glia. Intriguingly, this prior work also showed that inner ear dysfunction in *Spot* mutants specifically affects balance but not hearing, consistent with the absence of melanocytes in the vestibule only. Here, we report an analysis of the effect of *Nr2f1* upregulation on the development of both inner ear and skin melanocytes, also taking in consideration their origin relative to the dorsolateral and ventral NCC migration pathways. In the trunk, we found that NR2F1 overabundance in *Spot* NCCs forces dorsolaterally migrating melanoblasts to abnormally adopt a Schwann cell precursor (SCP) fate and conversely prevents ventrally migrating SCPs to normally adopt a melanoblast fate. In the head, *Nr2f1* upregulation appears not to be uniform, which might explain why SCP-derived melanocytes do colonize the cochlea while non-SCP-derived melanocytes cannot reach the vestibule. Collectively, these data point to a key role for NR2F1 in the control of SCP-vs-melanocyte fate choice and unveil a new pathogenic mechanism for WS4. Moreover, our data argue against the proposed existence of a transit-amplifying compartment of melanocyte precursors in hair follicles.

INTRODUCTION:

Waardenburg syndrome (WS) is characterized by a lack of pigmentation of the skin, eyes and hair as well as inner ear defects (Waardenburg, 1951). This condition is a classical neurocristopathy where abnormal development of neural crest cells (NCCs) mainly impact the formation of melanocytes (Pilon, 2021). Four types of WS have been described depending on the presence of other abnormalities (Pingault et al., 2010). In the case of WS Type IV (WS4), patients also suffer from aganglionic megacolon, as seen in Hirschsprung disease (Bergeron, Silversides, & Pilon, 2013; Shah et al., 1981). While the majority of WS4 cases appear to be due to mutations of the transcription factor-coding gene *SOX10* or genes involved in

the EDN3/EDNRB signaling pathway, approximately 35% cannot be explained by the mutation of a known gene (Pingault et al., 2010).

The Spot mouse model of WS4 was obtained through a pigmentation-based insertional mutagenesis screen for genes involved in NCC development (Pilon, 2016). The mutagenic insertion in the Spot genome perturbs a long-range interaction between a silencer element and the gene coding for the transcription factor NR2F1 (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1; also known as COUP-TF1), leading to its upregulation in NCCs (Bergeron et al., 2016). Mice homozygous for the Spot allele (hereinafter referred to as Nr2f1Spt/Spt animals) display a phenotype very similar to patients suffering from WS4, including a complete lack of fur pigmentation, inner ear dysfunction (spinning behavior) and aganglionic megacolon (Bergeron et al., 2016). Detailed characterization of enteric nervous system (ENS) development in Nr2f1Spt/Spt embryos showed that NCC-derived ENS progenitors failed to reach the distal colon because of NR2F1-induced premature differentiation in enteric glial cells (Bergeron et al., 2016). Hearing does not seem to be impaired in Nr2f1Spt/Spt animals, consistent with the presence of melanocytes in the stria vascularis of the cochlea (Bergeron et al., 2016). On the other hand, Nr2f1Spt/Spt animals develop severe balance problems due to the absence of vestibular melanocytes, which are presumably required for regulating endolymph homeostasis like in the cochlea (Bergeron et al., 2016). The reason why vestibular but not cochlear melanocytes are affected and the link, if any, with the lack of fur pigmentation is currently unknown.

Melanocytes derive from NCCs that emigrate from the dorsal neural tube along two distinct pathways (Mort, Jackson, & Patton, 2015). In the first route, NCCs fated to become either Schwann cells or melanoblasts (among other derivatives) migrate ventrally along developing nerves. These multipotent cells are best known as Schwann cell precursors (SCPs) (Furlan & Adameyko, 2018), and those that acquire a melanoblast identity will eventually detach from nerves and thereby generate a large proportion of melanocytes throughout the body (hereinafter

referred to as SCP-derived melanocytes) (Adameyko et al., 2009; Adameyko et al., 2012; Bonnamour, Soret, & Pilon, 2021; Kaucka et al., 2021). In the second route, NCCs migrate dorso-laterally under the primitive epidermis, where they directly differentiate into melanoblasts and melanocytes (hereinafter referred to as NCC-derived melanocytes) (Li, 2014; Sommer, 2011; Thomas & Erickson, 2008). In mice, the majority of skin melanocytes appear to be SCP-derived, being intermingled with NCC-derived melanocytes in a rather homogeneous manner in the epidermis as well as in the bulge and bulb compartments of hair follicles (Adameyko et al., 2009), from both dorsal and ventral skin (Bonnamour et al., 2021). In contrast, in the inner ear, the contribution of SCP-derived and NCC-derived melanocytes appear spatially restricted to the cochlea and vestibule, respectively (Bonnamour et al., 2021).

As observed for NCCs in general, melanoblasts are progressively generated over time along the elongating cranio-caudal axis, beginning in the cranial territory (Mort et al., 2015; Pilon, 2021). The relative generation of SCP-derived and NCC-derived melanoblasts also appears to vary in a temporal manner along the cranio-caudal axis. In the cranial territory, SCP-derived melanoblasts appear before NCC-derived melanoblasts whereas, in the trunk, both NCC- and SCP-derived melanoblasts become detectable at about the same time. In mouse embryos, cranial SCP-derived melanoblasts first appear in the vicinity of cranial nerves VII to X around embryonic day (e)9.5, colonizing the otic vesicle at e10.5 before the appearance of NCC-derived melanoblasts in the cranial epidermis at e11.5 (Adameyko et al., 2012; Kaucka et al., 2021). In the trunk, both NCC- and SCP-derived melanoblasts are first observed around e10.5, but SCP-derived melanoblasts do not reach the epidermis until e13 (Adameyko et al., 2009).

Here, we report a detailed characterization of the cellular mechanisms underlying the pigmentation and vestibular defects in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice. Interestingly, our analyses revealed a common NR2F1-induced alteration of cell fate switch between

SCPs and melanoblasts, affecting the developmental trajectory of both NCC-derived and SCP-derived melanocytes toward a glial fate. This mechanism appears to be under spatiotemporal regulation, specifically leaving cranial SCP-derived melanocytes unaffected and free to colonize the cochlea. Our characterization of hair follicles also suggests broader implications for the melanocyte field, allowing us to question the presumptive existence of a transit-amplifying compartment of melanocyte precursor cells at the base of hair follicles.

3.3 Results

3.3.1 Hair follicles of *Nr2f1Spt/Spt* mice are devoid of melanocytes..

Waardenburg syndrome (WS) is characterized by a lack of pigmentation of the skin, eyes and hair as well as inner ear defects (Waardenburg, 1951). This condition is a classical neurocristopathy where abnormal development of neural crest cells (NCCs) mainly impact the formation of melanocytes (Pilon, 2021). Four types of WS have been described depending on the presence of other abnormalities (Pingault et al., 2010). In the case of WS Type IV (WS4), patients also suffer from aganglionic megacolon, as seen in Hirschsprung disease (Bergeron, Silversides, & Pilon, 2013; Shah et al., 1981). While the majority of WS4 cases appear to be due to mutations of the transcription factor-coding gene *SOX10* or genes involved in the *EDN3/EDNRB* signaling pathway, approximately 35% cannot be explained by the mutation of a known gene (Pingault et al., 2010).

The Spot mouse model of WS4 was obtained through a pigmentation-based insertional mutagenesis screen for genes involved in NCC development (Pilon, 2016). The mutagenic insertion in the Spot genome perturbs a long-range interaction between a silencer element and the gene coding for the transcription factor *NR2F1* (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1; also known as *COUP-TF1*), leading to its upregulation in NCCs (Bergeron et al., 2016). Mice homozygous for the Spot allele (hereinafter referred to as *Nr2f1Spt/Spt* animals) display a phenotype very similar to patients suffering from WS4, including a complete lack of fur pigmentation, inner ear dysfunction (spinning behavior) and

aganglionic megacolon (Bergeron et al., 2016). Detailed characterization of enteric nervous system (ENS) development in *Nr2f1Spt/Spt* embryos showed that NCC-derived ENS progenitors failed to reach the distal colon because of NR2F1-induced premature differentiation in enteric glial cells (Bergeron et al., 2016). Hearing does not seem to be impaired in *Nr2f1Spt/Spt* animals, consistent with the presence of melanocytes in the stria vascularis of the cochlea (Bergeron et al., 2016). On the other hand, *Nr2f1Spt/Spt* animals develop severe balance problems due to the absence of vestibular melanocytes, which are presumably required for regulating endolymph homeostasis like in the cochlea (Bergeron et al., 2016). The reason why vestibular but not cochlear melanocytes are affected and the link, if any, with the lack of fur pigmentation is currently unknown.

Melanocytes derive from NCCs that emigrate from the dorsal neural tube along two distinct pathways (Mort, Jackson, & Patton, 2015). In the first route, NCCs fated to become either Schwann cells or melanoblasts (among other derivatives) migrate ventrally along developing nerves. These multipotent cells are best known as Schwann cell precursors (SCPs) (Furlan & Adameyko, 2018), and those that acquire a melanoblast identity will eventually detach from nerves and thereby generate a large proportion of melanocytes throughout the body (hereinafter referred to as SCP-derived melanocytes) (Adameyko et al., 2009; Adameyko et al., 2012; Bonnamour, Soret, & Pilon, 2021; Kaucka et al., 2021). In the second route, NCCs migrate dorso-laterally under the primitive epidermis, where they directly differentiate into melanoblasts and melanocytes (hereinafter referred to as NCC-derived melanocytes) (Li, 2014; Sommer, 2011; Thomas & Erickson, 2008). In mice, the majority of skin melanocytes appear to be SCP-derived, being intermingled with NCC-derived melanocytes in a rather homogeneous manner in the epidermis as well as in the bulge and bulb compartments of hair follicles (Adameyko et al., 2009), from both dorsal and ventral skin (Bonnamour et al., 2021). In contrast, in the inner ear, the contribution of SCP-derived and NCC-

derived melanocytes appear spatially restricted to the cochlea and vestibule, respectively (Bonnamour et al., 2021).

As observed for NCCs in general, melanoblasts are progressively generated over time along the elongating cranio-caudal axis, beginning in the cranial territory (Mort et al., 2015; Pilon, 2021). The relative generation of SCP-derived and NCC-derived melanoblasts also appears to vary in a temporal manner along the cranio-caudal axis. In the cranial territory, SCP-derived melanoblasts appear before NCC-derived melanoblasts whereas, in the trunk, both NCC- and SCP-derived melanoblasts become detectable at about the same time. In mouse embryos, cranial SCP-derived melanoblasts first appear in the vicinity of cranial nerves VII to X around embryonic day (e)9.5, colonizing the otic vesicle at e10.5 before the appearance of NCC-derived melanoblasts in the cranial epidermis at e11.5 (Adameyko et al., 2012; Kaucka et al., 2021). In the trunk, both NCC- and SCP-derived melanoblasts are first observed around e10.5, but SCP-derived melanoblasts do not reach the epidermis until e13 (Adameyko et al., 2009).

Here, we report a detailed characterization of the cellular mechanisms underlying the pigmentation and vestibular defects in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice. Interestingly, our analyses revealed a common NR2F1-induced alteration of cell fate switch between SCPs and melanoblasts, affecting the developmental trajectory of both NCC-derived and SCP-derived melanocytes toward a glial fate. This mechanism appears to be under spatiotemporal regulation, specifically leaving cranial SCP-derived melanocytes unaffected and free to colonize the cochlea. Our characterization of hair follicles also suggests broader implications for the melanocyte field, allowing us to question the presumptive existence of a transit-amplifying compartment of melanocyte precursor cells at the base of hair follicles.

3.3.2 NR2F1 overexpression in Nr2f1Spt/Spt mice leads to abnormal differentiation of NCC-derived skin melanoblasts into SCP-like cells.

We previously reported that the aganglionic megacolon of Nr2f1Spt/Spt mice was due to NR2F1-induced activation of a pro-gliogenic transcriptomic program leading to premature glial differentiation of ENS progenitors (Bergeron et al., 2016). To verify if a similar mechanism could be at play in the melanocyte lineage, we first undertook a marker analysis of NCC-derived melanoblasts in cross-sections of e12.5 embryos at forelimb level. Consistent with our prior findings in the developing ENS, we found that the proportion of KIT-positive melanoblasts also expressing NR2F1 in the dorsolateral migration pathway increases from 23% \pm 13% in control FVB/N embryos to 94% \pm 10% in Nr2f1Spt/Spt embryos (Figure 2A-B). Remarkably, this rise in NR2F1-expressing melanoblasts is also accompanied by a similar increase for S100 β , a SCP marker (Figure S1). Indeed, 93.5% \pm 6% of KIT-positive melanoblasts from Nr2f1Spt/Spt embryos are also positive for S100 β , which is normally not expressed in KIT-positive melanoblasts from control FVB/N embryos (Figure 2C-D). The same observation was made for PLP1 (Figure 2E-F), another marker of SCPs (Figure S1). To verify the fate of these cells with melanoblast-SCP hybrid identity, we then performed an 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) pulse-chase assay (Figure 3). As expected, analysis of cross-sections of e15.5 control FVB/N embryos that were exposed to EdU at e12.5 showed numerous KIT-positive and PLP1-negative melanoblasts that had previously incorporated EdU. In marked contrast, the same experiment with Nr2f1Spt/Spt embryos showed a complete absence of KIT-positive cells, with EdU incorporation being restricted to cells positive for PLP1 only (Figure 3). This strongly suggests that the melanoblast-SCP hybrid identity observed at e12.5 is an intermediary state toward a definitive SCP/Schwann cell identity that is reached at e15.5. These results are thus consistent with the notion that NR2F1 has pro-gliogenic effects in NCC-derived melanoblasts of Nr2f1Spt/Spt embryos as it does in ENS progenitors.

3.3.3 NR2F1 overexpression in *Nr2f1*Spt/Spt mice prevents the normal differentiation of SCPs into skin melanocytes.

To verify the impact of the *Spot* mutation on the development of SCP-derived skin melanoblasts, we again took advantage of the *Dhh* promoter-driven genetic cell lineage tracing tool but now focusing our study on peripheral nerves from e12.5 embryos. Analysis of ventral rami at forelimb level showed numerous KIT and YFP double-positive melanoblasts (i.e., SCP-derived) in cross-sections of control *Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* embryos but none in mutant *Nr2f1Spt/Spt;Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* embryos (Figure 4A). Further analysis revealed that NR2F1 is normally expressed in most SCPs from control *Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* embryos (Figure 4B) and that NR2F1 expression levels but not number of NR2F1-expressing cells are increased in ventral rami of *Nr2f1Spt/Spt;Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* embryos (Figure 4B-D). These observations strongly suggest that the increased levels of NR2F1 in mutant *Nr2f1Spt/Spt* SCPs definitively block them in a SCP/Schwann cell fate at the expense of SCP-derived melanoblasts.

3.3.4 The *Spot* mutation differentially impacts the colonization of NCC-derived and SCP-derived melanocytes in the inner ear.

We previously reported that inner ear defects in *Nr2f1Spt/Spt* mice are restricted to the vestibule (Bergeron et al., 2016). More recent work suggests that this could be explained, at least in part, by the spatially restricted contribution of NCC-derived and SCP-derived melanocytes to the vestibular and cochlear compartments of the inner ear, respectively (Bonnamour et al., 2021). To verify this possibility, we turned to the *Dhh* promoter-driven genetic cell lineage tracing tool once again. As previously reported, analysis of inner ears from control *Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* mice at P12 showed that the vestibule contains NCC-derived melanocytes (i.e., KIT-positive but YFP-negative) while the cochlea contains SCP-derived melanocytes (i.e., KIT and YFP double-positive) (Figure 5A-B). In mutant *Nr2f1Spt/Spt;Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* mice, cochlear SCP-derived melanocytes seem unaffected and only vestibular NCC-derived

melanocytes are absent (Figure 5A-B). As these observations suggested that cranial SCP-derived melanoblasts are not impacted like SCP-derived melanoblasts in the trunk, we then analyzed melanoblast colonization in cross-sections of developing inner ears at e12.5 (Figure 6). In control *Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* embryos, NCC-derived melanoblasts (i.e., KIT-positive but YFP-negative) are present in the first branchial cleft while SCP-derived melanoblasts (i.e., KIT and YFP double-positive) are visible in the more internal part of the ear canal, near β 3Tubulin-positive nerve projections (Figure 6A). In mutant *Nr2f1Spt/Spt;Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP* embryos, NCC-derived melanoblasts are not detected in the first branchial cleft whereas SCP-derived melanoblasts are observed along nerve projections like in control embryos (Figure 6B). In an effort to understand why cranial but not trunk SCP-derived melanoblasts are affected by the *Spot* mutation, we found that NR2F1 overexpression in SCPs associated with cranial nerves at e10.5 is lower than in SCPs associated with peripheral nerves at e12.5 (2.01-fold vs 3.74-fold, respectively; Figure S1 and Figure 4B-C).

3.4 Discussion

The study of melanocyte development in *Nr2f1Spt/Spt* mice suggests that the pigmentation and inner ear defects observed in WS are due to the dysregulation of melanocyte development from both ventral and dorso-lateral migration pathways. Combined with other recently published data (Kaucka et al., 2021), our work further suggests that perturbation of a SCP-vs-melanocyte cell fate switch is at the heart of the underlying molecular mechanism. As discussed below, our observations also allow us to shed new light on the potential existence of an intermediate melanocyte precursor state between MSCs in the bulge and mature melanocytes in the bulb (Liao et al., 2017).

3.4.1 Dysregulation of SCP-vs-melanocyte cell fate switch is likely a common gene defect-independent theme in WS

The impaired formation of NCC-derived and SCP-derived melanocytes in the trunk of *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice appears to be due to a common NR2F1-induced perturbation of SCP-vs-melanocyte cell fate switch during development, which is evidenced by acquisition of SCP identity in the case of NCC-derived melanoblasts or forced maintenance of SCP identity in the case of SCP-derived melanoblasts. These results are in total agreement with the well-recognized ability of melanoblasts and Schwann cells to transdifferentiate into each other *in vitro* (Dupin, Glavieux, Vaigot, & Le Douarin, 2000; Dupin, Real, Glavieux-Pardanaud, Vaigot, & Le Douarin, 2003; Real, Glavieux-Pardanaud, Le Douarin, & Dupin, 2006). Yet, supplemental immunofluorescence data for EDNRB suggest that the NR2F1-induced acquisition of SCP identity by NCC-derived melanoblasts/melanocytes *in vivo* might in fact occur via a relatively slow transitory phase, and not quick transdifferentiation *per se*. Indeed, at a stage (e12.5) when EDNRB normally becomes dispensable for progression of melanocyte differentiation from dorso-laterally migrating NCCs (Shin, Levorse, Ingram, & Tilghman, 1999), we found that the proportion of KIT and EDNRB double-positive cells is almost doubled in *Nr2f1*^{Spt/Spt} embryos (~75% of all KIT⁺ cells) compared to WT (~40% of all KIT⁺ cells) (Figure S3). Among many different roles during melanocyte development, EDN3/EDNRB signaling has notably been reported to be important for the maintenance of multipotent NCCs and SCP-melanocyte bipotential progenitors (Bondurand, Dufour, & Pingault, 2018; Saldana-Caboverde & Kos, 2010). Abnormal prolongation of an uncommitted phase might thus be needed for NR2F1 to exert its pro-gliogenic effects. However, we cannot also exclude the possibility that the higher proportion of KIT and EDNRB double-positive cells in *Nr2f1*^{Spt/Spt} embryos might simply reflect a vain attempt to rescue melanocyte differentiation by antagonizing SCP differentiation. The fact that EDNRB loss accelerate Schwann cell differentiation is consistent with this possibility (Brennan et al., 2000).

More generally, perturbation of the SCP-vs-melanocyte cell fate switch might well constitute a common pathogenic mechanism for WS, and most especially WS4 that is mainly caused by loss of either EDN3/EDNRB signaling or SOX10 transcription factor activity (Pingault et al., 2010). In the cranial territory, perturbation of the SCP-vs-melanocyte cell fate switch notably appears to explain the inner ear defect of the *Ednrb*-null mouse model of WS4. Indeed, in e10.5 *Ednrb*-null embryos, SCP-derived melanoblasts are either undetectable in the facial (VII) and vestibulocochlear (VIII) nerves or unable to detach from the glossopharyngeal (IX) and vagal (X) nerves (Kaucka et al., 2021). Given that SCP-derived melanoblasts are the main source of cochlear melanocytes (Bonnamour et al., 2021), this phenotype explains why EDNRB loss-of-function mutations are associated with deafness (Issa et al., 2017) while *Nr2f1* gain-of-function in Spot mice is not (Bergeron et al., 2016). Our data suggest that cochlea colonization by SCP-derived melanoblasts is not affected in *Nr2f1*Spt/Spt embryos because NR2F1 is not overexpressed in cranial SCPs as much as it is in trunk SCPs, or in cranial/trunk NCC-derived melanoblasts. This observation is consistent with our initial characterization of *Nr2f1*Spt/Spt animals showing that cranial NCC-derived structures other than melanocytes are grossly unaffected except for the hypoglossal nerve – the most caudal of the cranial nerves (Bergeron et al., 2016). The exact molecular mechanism underlying this regional difference is unknown but it is most likely linked to the spatiotemporal regulation of *Nr2f1* expression and the fact that cranial SCP-derived melanoblasts are the first melanoblasts to be generated during development (Adameyko et al., 2012). Another not necessarily mutually exclusive possibility to consider is that cranial SCPs might simply be less gliogenic than trunk SCPs, at least in part because cranial SCPs also express the pro-neuronal transcription factor PHOX2B (Dyachuk et al., 2014; Espinosa-Medina et al., 2014; Furlan & Adameyko, 2018).

Overall, EDN3/EDNRB, SOX10, and NR2F1 can apparently all be functionally linked by their influence on the SCP-vs-melanocyte cell fate switch. Although the global picture is certainly more complex, EDN3/EDNRB and SOX10 both appear

to at least share a role in the maintenance of a bipotential state (Mollaaghababa & Pavan, 2003; Saldana-Caboverde & Kos, 2010). Loss of either EDN3/EDNRB or SOX10 would thus first perturb this early function before perturbing any other later function these proteins might also have in melanoblast/melanocyte and SCP/Schwann cell differentiation. This further suggests that SCP is somehow a default differentiation pathway for SCP-melanoblast bipotential progenitors, which can be enhanced by a pro-gliogenic factor like NR2F1.

3.4.2 NR2F1 is potent pro-gliogenic transcription factor in the NCC lineage

Taken together with our prior discovery of premature enteric gliogenesis in *Nr2f1*Spt/Spt embryos (Bergeron et al., 2016), our data indicate that NR2F1 is a general and potent pro-gliogenic transcription factor in the NCC lineage. Interestingly, such a role is reminiscent of the later role played by SOX10 beyond its early role in the maintenance of uncommitted NCC-derived progenitors (Mollaaghababa & Pavan, 2003). Of note, several SOX10-regulated genes important for acquisition of a glial identity such as *Fabp7*, *Mpz*, *Mbp* and *Plp1* are upregulated in *Nr2f1*Spt/Spt enteric progenitors (Bergeron et al., 2016), suggesting a functional relationship between NR2F1 and SOX10. Also supportive of such a relationship, there is a specific enrichment of consensus binding motifs for NR2F1 close to SOX10 ChIP-seq peaks in Schwann cells, which further suggest that they might specifically co-orchestrate SCP/Schwann cell differentiation (Lopez-Anido et al., 2015). The co-expression of NR2F1 and SOX10 in e12.5 nerve-associated SCPs further support this idea (Figure 4). Based on their ability to repress canonical WNT/ β Catenin signaling in different contexts (Faedo et al., 2008; Tong et al., 2014), it is also tempting to speculate that NR2F1 and SOX10 might actively counteract melanocyte differentiation in SCPs via inhibition of the pro-melanogenic WNT/ β Catenin pathway (Colombo et al., 2022).

3.4.3 Are KIT-positive cells at the very bottom of hair follicles really melanocytes?

In 2017, Liao and colleagues identified what they refer to as a niche of melanocyte precursors located deep at the base of follicles, below the line of Auber (Liao et al.,

2017). These presumptive precursors express KIT (but not DCT) and are thus presumably responsive to hair shaft-derived SCF (Stem cell factor; also known as KIT ligand), which was shown to be essential for the maintenance of mature KIT/DCT double-positive melanocytes above the line of Auber (Liao et al., 2017). Since SCF was found to be dispensable for the maintenance of these presumptive precursors (Liao et al., 2017) – as it is for the maintenance of KIT/DCT double-positive MSCs (Nishimura et al., 2002) –, these cells were considered to be a new intermediate state between MSCs in the bulge and mature melanocytes above the line of Auber (Zocco & Blanpain, 2017). Our data now question this interpretation. Strikingly, we found that the presumptive KIT-positive precursors remain present below the line of Auber despite the absence of both MSCs in the bulge and mature melanocytes above the line of Auber from the same follicles (Figure 1C). Moreover, our cell lineage tracing data show numerous KIT/YFP double-positive cells among both MSC and mature melanocyte populations but none in the presumptive niche of precursors from the same follicles (Figure 1D). A potential explanation for this discrepancy could be that the KIT-positive cells below the line of Auber is a distinct MSC population exclusively constituted by NCC-derived melanoblasts – and thus totally independent from the bulge-associated MSCs that are mostly SCP-derived (Figure 1C-D) (Bonnamour et al., 2021). Another explanation could be that the KIT-positive cells below the line of Auber are simply not related to the melanocyte lineage, as suggested by the specific lack of DCT expression in these cells compared to both MSCs in the bulge and mature melanocytes above the line of Auber (Figure 1C) (Liao et al., 2017). Clearly, addressing these questions will represent exciting and important future lines of research.

3.5 Materials and methods

3.5.1 Animals

Work with mice was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the relevant institutional

committee [Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA); CIPA reference #650] of University of Quebec at Montreal (UQAM). Mice were euthanized using gradual-fill carbon dioxide (CO₂) gas after isoflurane anesthesia. To generate embryos, mice were mated overnight, and noon on the day of vaginal plug detection was designated as e0.5.

3.5.2 Preparation and analysis of embryonic and postnatal tissues via immunofluorescence.

Embryonic tissues harvested at e12.5 and e15.5 were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (diluted in phosphate-buffered saline) and cut into 20 μ m sections using a Leica CM1950 cryostat. For the analysis of cochlea and vestibule, P12 inner ears were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then left to demineralize in 0.5M EDTA (diluted in phosphate-buffered saline) for 8 days with daily renewal of the solution, and then cut into 100 μ m sections using a Microm HM 650V vibrating blade microtome (Thermo Scientific). For skin analysis, P12 mice were depilated using Nair Sensitive Care Hair Removal Cream for 8 minutes. A 1 cm² piece of back skin was then dissected, fixed in 4% paraformaldehyde overnight, and sectioned in 10 μ m sections using a Leica CM1950 cryostat.

After 1h in blocking solution (5% FBS and 1% Triton-X100, diluted in phosphate-buffered saline), tissue samples were incubated overnight with different antibodies targeting β III-Tubulin (Abcam #ab78078; diluted 1:250), GFP (Abcam #ab290; diluted 1:200, or #ab6673; diluted 1:500), KIT (R&D Systems #AF1356; diluted 1:50), NR2F1 (Abcam #ab181137; diluted 1:500), PLP1 (Abcam #ab28486; diluted 1:500), S100 β (Novus Biologicals #NBP1-41373SS; diluted 1:500), or DCT (Abcam #ab74073; diluted 1:500). After extensive washes in blocking solution, samples were then incubated with relevant secondary antibodies conjugated with AlexaFluor 488, 594 or 647 (Jackson ImmunoResearch; diluted 1:500) for 1h and counterstained with DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) for 1 min. Images were

acquired with a Nikon A1 confocal microscope with Plan Fluor 20x/0.75 Mimm and Plan Apo λ 60x1.40 objectives. All images were analyzed using ImageJ.

3.5.3 EdU pulse-chase assay.

For in utero labeling at e12.5, pregnant mice were administered 10 μ L of a 10 mmol/L EdU solution via intraperitoneal injection. Embryos were then collected at e15.5 and EdU incorporation was detected using the Click-iT protocol with Alexa Fluor 488 dye, in accordance with manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific #C10337).

3.5.4 Statistics.

Where applicable, data are presented as mean \pm s.d., with the number of measurements (n) and the number of animals used (N) included in the figure and/or legend. Statistical significance of quantified data was determined using the Student's t-test (two-tailed) in Graphpad Prism. Differences were considered statistically significant when the P-value was less than 0.05.

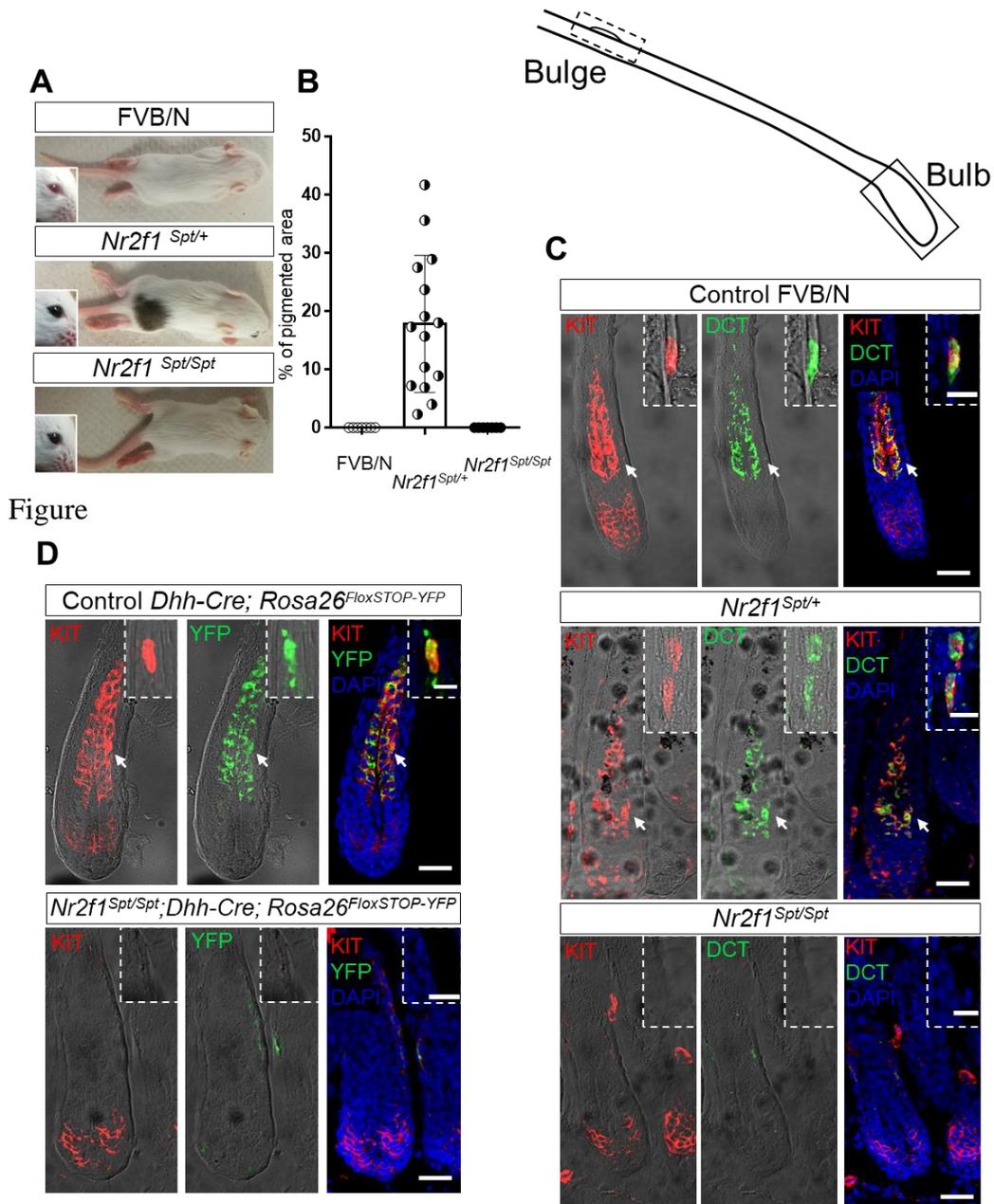
Acknowledgements:

The authors thank Denis Flipo (Cellular analyses and Imaging core, CERMO-FC, UQAM) for assistance with confocal imaging. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to NP (grant #RGPIN-2019-07076). NP was also supported by the Fonds de la recherche du Québec – Santé (FRQS Senior Research Scholar) and by the UQAM Research Chair on Rare Genetic Diseases, while GB and BC were both supported by doctoral scholarships from the CERMO-FC.

Conflict of Interest Statement: The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions: NP conceived and supervised the study; GB and NP designed the experiments; GB and BC performed the experiments and collected data; All authors analyzed and interpreted data; GB and BC drafted the manuscript; NP edited the manuscript; All authors revised the manuscript.

3.6 FIGURES



Figure

Figure 3.1. Fur pigmentation defects in the Spot mouse line. (A-B) Representative pictures of fur and eye pigmentation (A), with associated quantification of pigmented fur area (B) from P12 control FVB/N, heterozygous *Nr2f1**Spt*/+ and homozygous *Nr2f1**Spt*/*Spt* mice. (C) Representative confocal microscopy images of 10 μ m transverse sections of back skin immunolabeled with antibodies against KIT and DCT, and counterstained with DAPI (blue). Mature

melanocytes in the bulb (arrow) and MSCs in the bulge (inset) are visible in follicles from control FVB/N mice and pigmented fur areas of Nr2f1Spot/+ mice but not in follicles from unpigmented fur areas of Nr2f1Spot/+ and Nr2f1Spt/Spt mice (n > 100 follicles). (D) Representative confocal microscopy images of 10µm transverse sections of back skin from control Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP and mutant Nr2f1Spt/Spt;Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP immunolabeled with antibodies against KIT and YFP. YFP-positive SCP-derived mature melanocytes (arrow) and MSCs (inset) are visible in control but absent in mutant follicles (n > 120 follicles). All displayed images are z-stack projections representative of observations made from N ≥ 4 mice. Scale bar, 50µm.

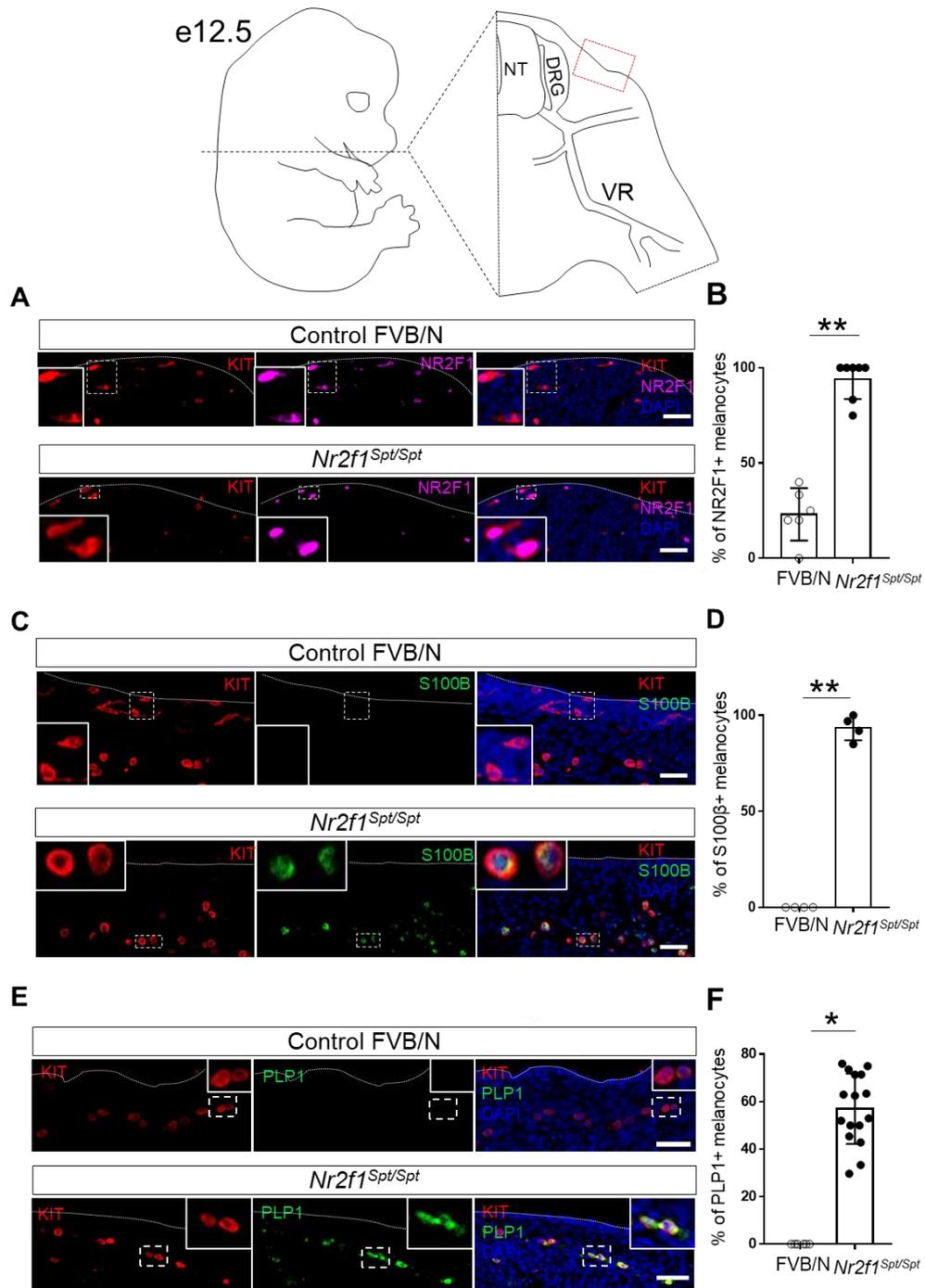


Figure 3.2. Abnormal differentiation of NCC-derived melanoblasts in e12.5 *Nr2f1^{Spt/Spt}* embryos.

(A-C) Immunofluorescence-based analysis of 20 μ m transverse sections of e12.5 embryos, taken from region indicated in the schematic representation at the top

(NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; VR, ventral ramus). Control FVB/N and Nr2f1^{Spt/Spt} tissues were immunolabeled with antibodies against melanoblast marker KIT and either NR2F1 (A) or SCP markers S100 β (B) or PLP1 (C), and counterstained with DAPI. Representative confocal microscopy images are displayed on the left while accompanying quantitative analysis of double-positive cells is shown on the right ($n > 120$ KIT-positive cells per condition). A higher proportion of KIT-positive NCC-derived melanoblasts express NR2F1 and SCP markers in Nr2f1Spt/Spt embryos. All displayed images are z-stack projections representative of observations made from $N \geq 6$ mice. ** $P < 0.01$, two-tailed Student's t-test. Scale bar, 50 μ m.

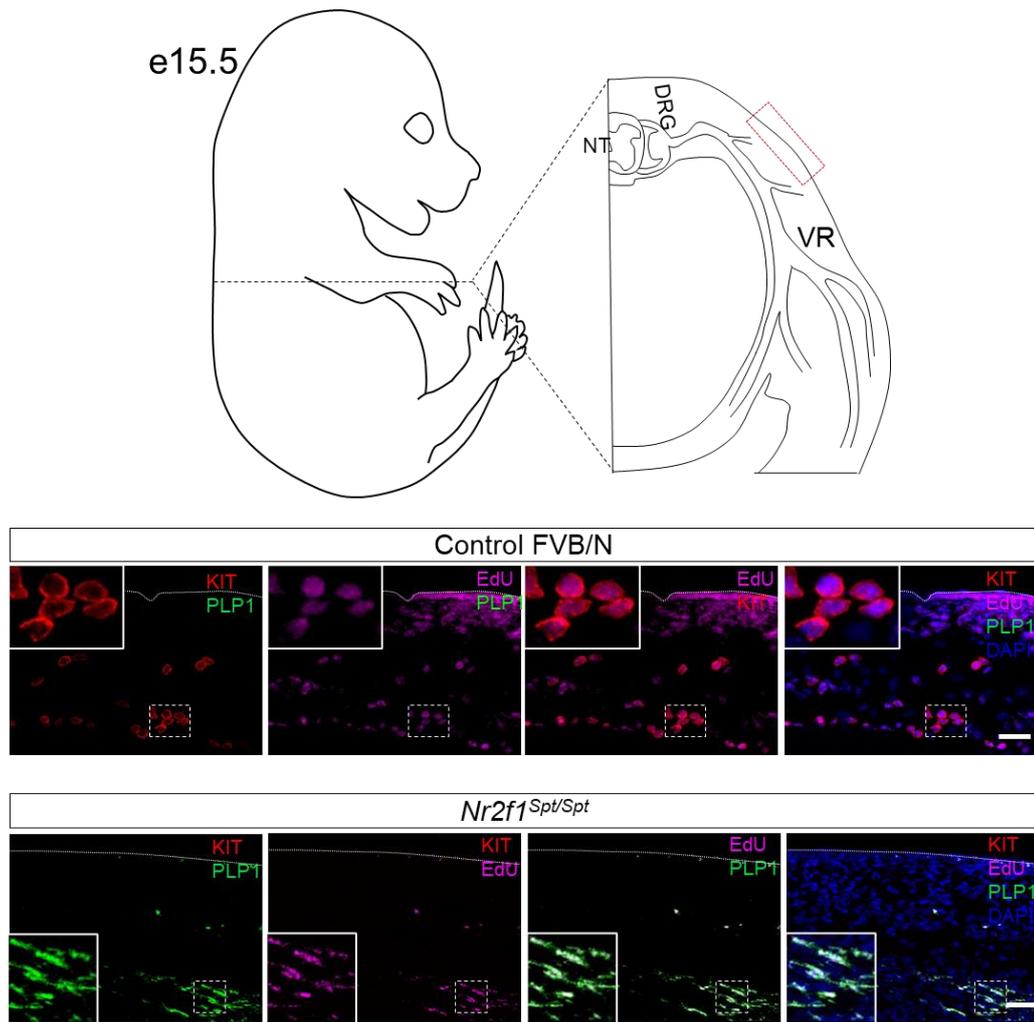


Figure 3.3. Abnormal differentiation of NCC-derived melanoblasts in e15.5 $Nr2f1^{Spt/Spt}$ embryos.

Pulse-chase analysis of NCC-derived melanoblasts in 20µm transverse sections of e15.5 embryos that were previously exposed to EdU at e12.5. Displayed representative images were taken from region indicated in the schematic representation at the top (NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; VR, ventral ramus). Control FVB/N and $Nr2f1^{Spt/Spt}$ tissues were immunolabeled with KIT and PLP1 antibodies and counterstained with DAPI. EdU incorporation was revealed using click chemistry. KIT and EdU double-positive NCC-derived melanoblasts in controls are replaced by PLP1 and EdU double-positive cells in mutants. All displayed confocal images are z-stack projections representative of observations made from $N \geq 3$ mice. Scale bar, 100µm.

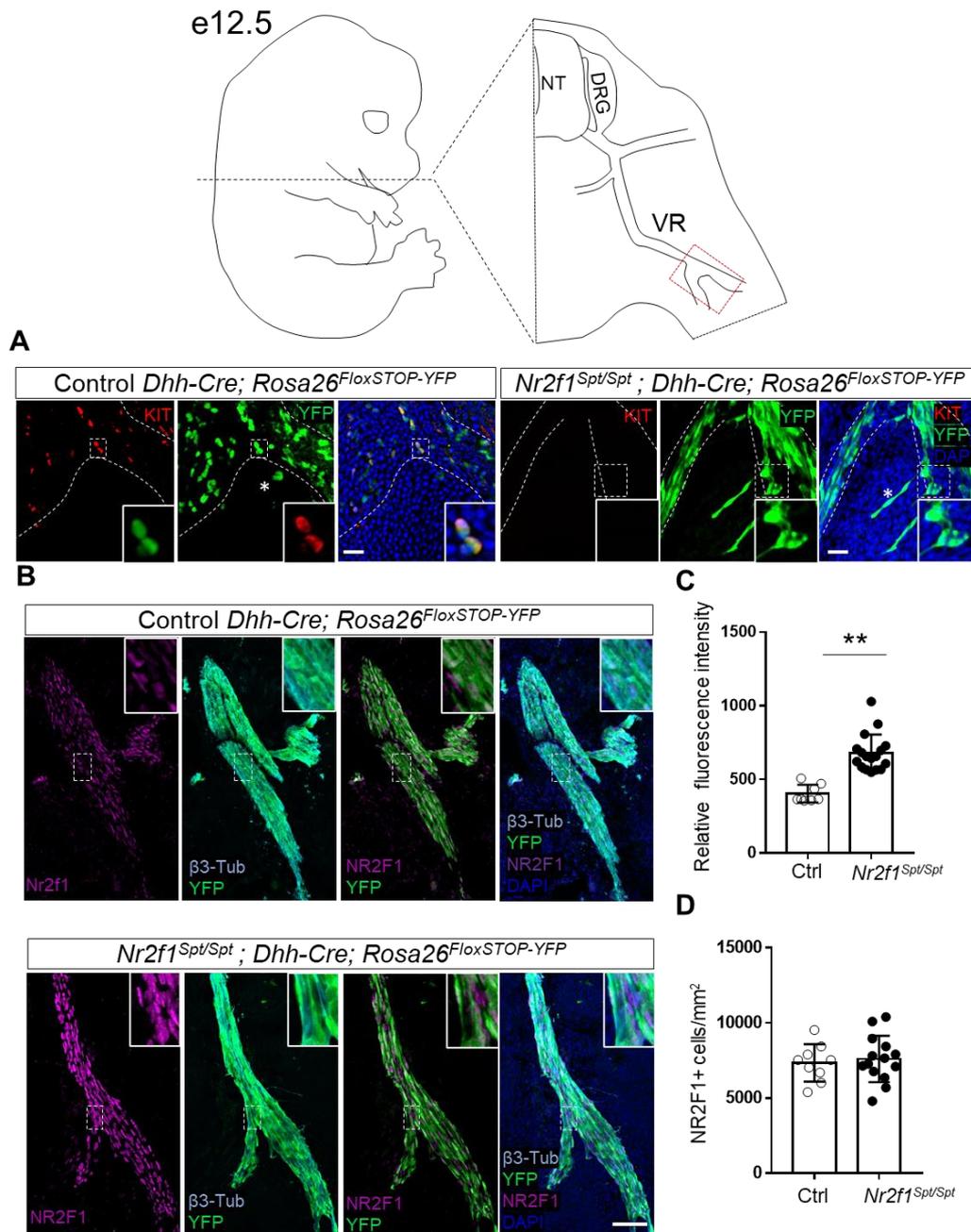
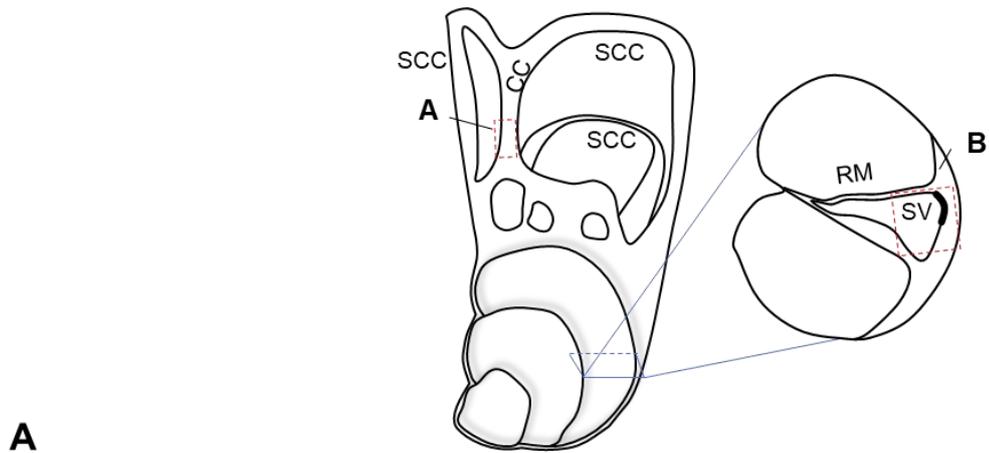


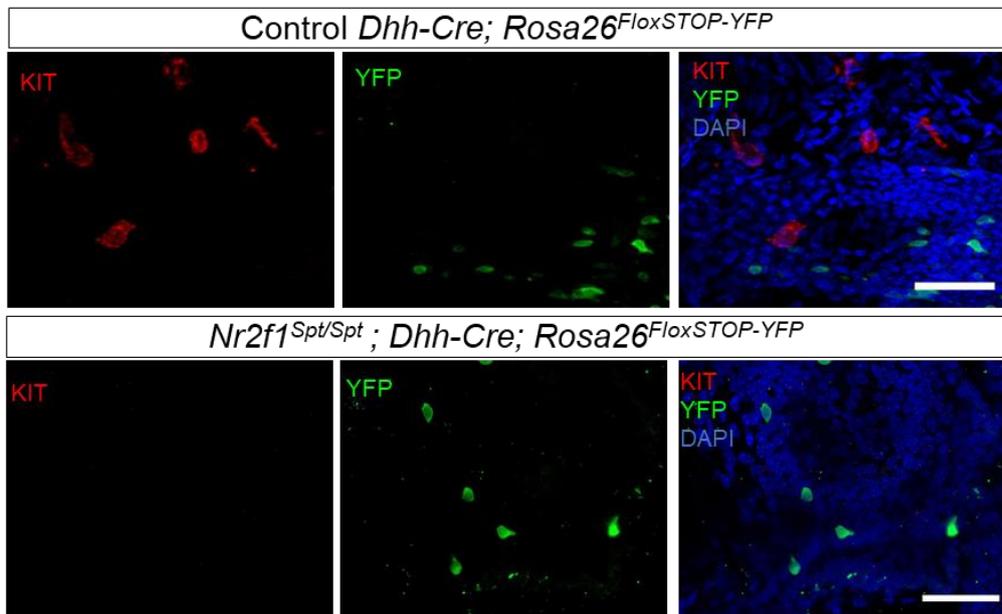
Figure 3.4. Impaired differentiation of SCP-derived melanoblasts in e12.5 *Nr2f1^{Spt/Spt}* embryos.

(A-B) Immunofluorescence-based analysis of 20 μ m transverse sections of e12.5 embryos, taken from region indicated in the schematic representation at the top (NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; VR, ventral ramus). Control *Dhh-Cre; Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* and mutant *Nr2f1^{Spt/Spt}; Dhh-Cre; Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*

YFP tissues were immunolabeled with antibodies against either KIT and YFP (A) or NR2F1, β 3-Tubulin and YFP (B). NR2F1 is present in YFP-positive SCPs along β 3-Tubulin-positive nerves in both controls and mutants, but these cells fail to differentiate into KIT-positive melanoblasts in mutants. (C-D) Quantitative analysis of NR2F1 immunofluorescence signal intensity (C) and density of NR2F1-positive cells (D) along β 3-Tubulin-positive nerves ($n > 1400$ cells per condition). Expression level but not cell density is significantly increased in mutants. All displayed confocal images are z-stack projections representative of observations made from $N \geq 3$ mice. ** $P < 0.01$, two-tailed Student's t-test. Scale bar, 50 μ m..



A



B

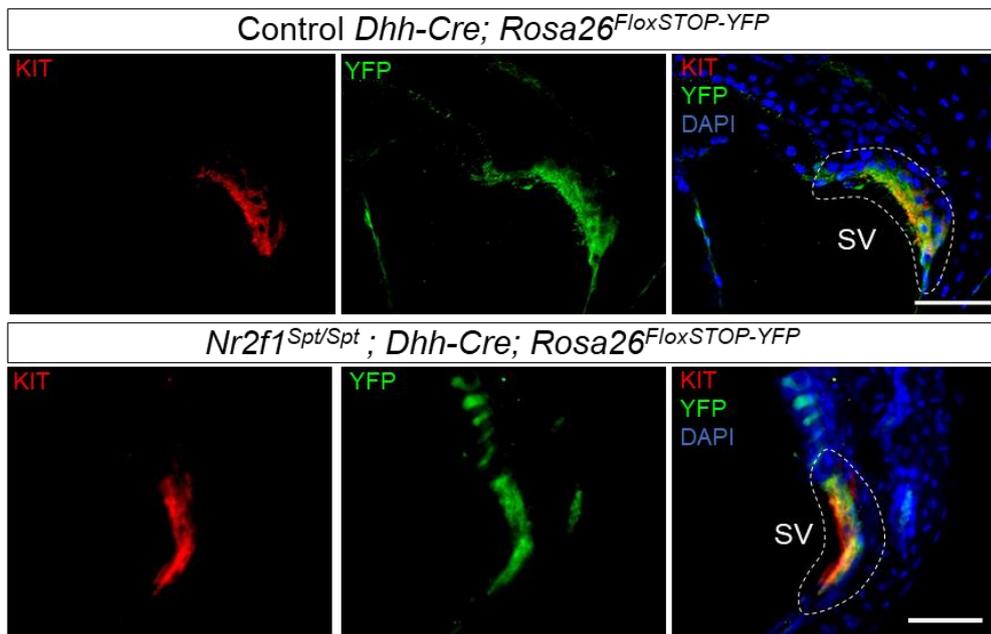


Figure 3.5. SCP-derived cochlear melanocytes but not NCC-derived vestibular melanocytes are present in Nr2f1Spt/Spt mice.

(A-B) Immunofluorescence-based analysis of 50 μ m sections of P12 inner ears, taken from different regions indicated in the schematic representation at the top (SCC, semicircular canal; CC, common crus; RM, Reissner's membrane; SV, stria vascularis). Vestibule (A) and cochlea (B) of control Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP and mutant Nr2f1Spt/Spt;Dhh-Cre;Rosa26FloxSTOP-YFP tissues were immunolabelled with antibodies against KIT and YFP, and counterstained with DAPI. KIT-positive but YFP-negative NCC-derived vestibular melanocytes are absent in mutants, while KIT and YFP double-positive SCP-derived melanocytes are visible in the stria vascularis of both controls and mutants. All displayed confocal images are z-stack projections representative of observations made from $N \geq 3$ mice. Scale bar, 50 μ m.

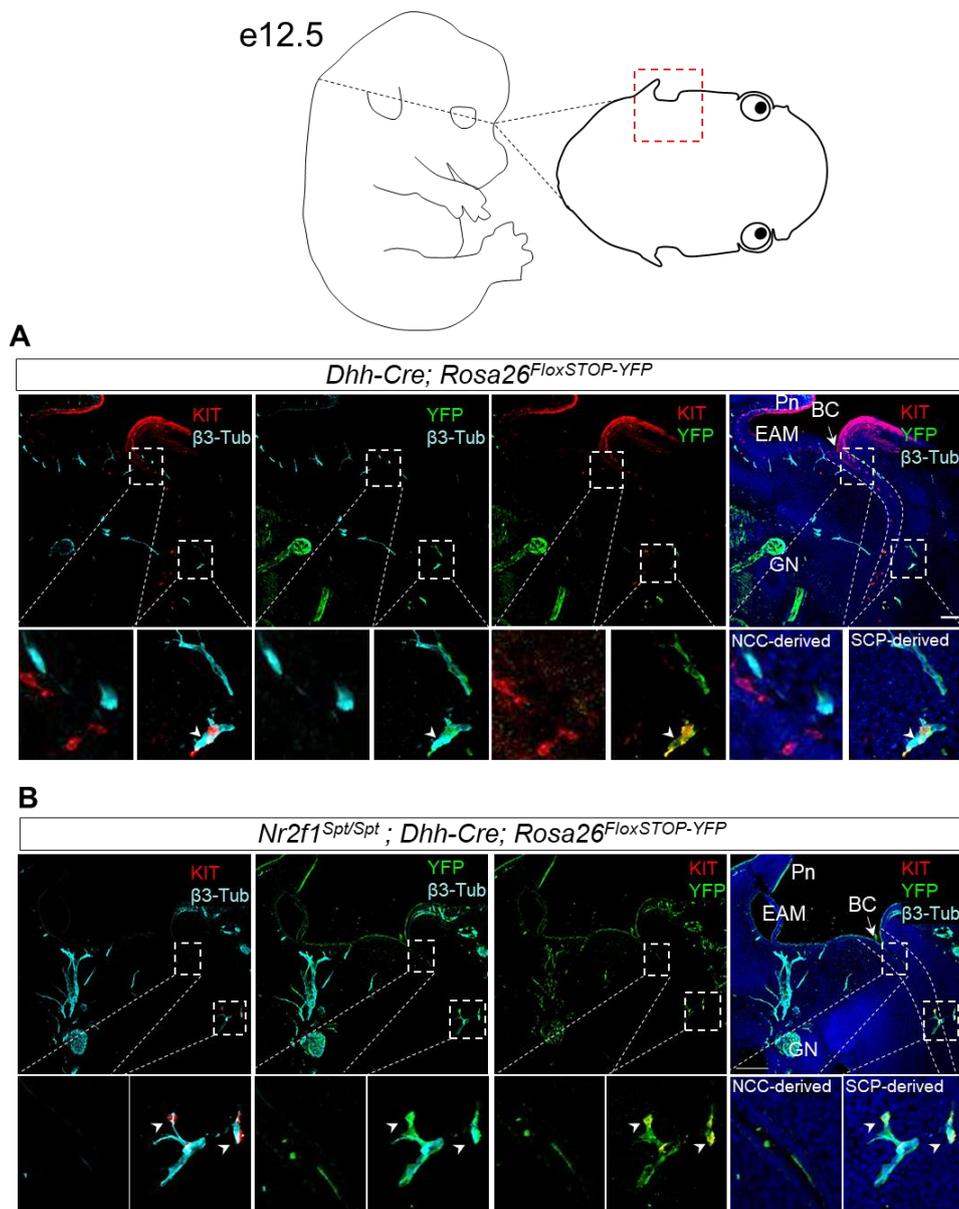


Figure 3.6. Cranial SCP-derived melanoblasts are not impacted by the Spot mutation.

(A-B) Immunofluorescence-based analysis of 20µm transverse sections of e12.5 embryos, taken from region indicated in the schematic representation at the top. Control *Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* (A) and mutant *Nr2f1^{Spt/Spt};Dhh-Cre;Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* (B) tissues were immunolabeled with antibodies against KIT, β3-Tubuline and YFP, and counterstained with DAPI. Control inner ears are colonized by both KIT-positive NCC-derived melanoblasts from the

epidermis at the level of the first branchial cleft and in KIT and YFP double-positive SPC-derived melanoblasts via β 3-Tubulin-positive nerves. In mutant inner ears, only KIT and YFP double-positive SCP-derived melanoblasts are detected. All displayed confocal images are z-stack projections representative of observations made from $N \geq 4$ mice. Pn, Pinna; EAM, External auditory meatus; BC, Branchial cleft; GN, glossopharyngeal nerve. Scale bar, 100 μ m.

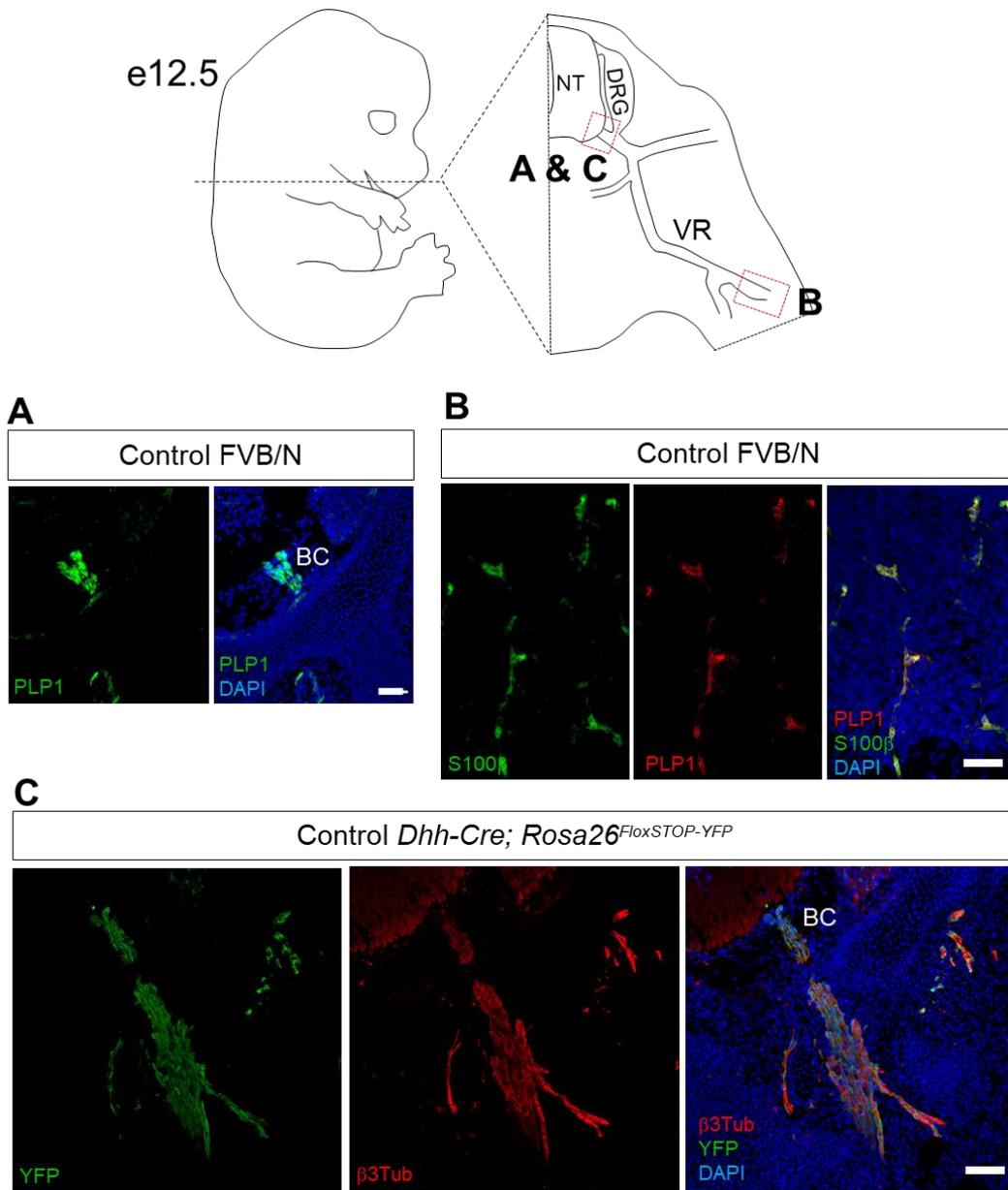


Figure S1. SCPs in boundary caps and along peripheral nerves are positive for PLP1, S100b and DHH. (A-C) Immunofluorescence-based analysis of 20 μ m transverse sections of e12.5 embryos, taken from region indicated in the schematic representation at the top (NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; VR, ventral ramus). Control FVB/N tissues were labeled with antibodies against either PLP1 (A) or S100 β and PLP1 (B), while *Dhh-Cre; Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* tissues were labeled with antibodies against GFP/YFP and β 3-Tubulin. All displayed confocal images are z-stack projections representative of observations made from N = 3 embryos. BC, Boundary Cap. Scale bar, 50 μ m.

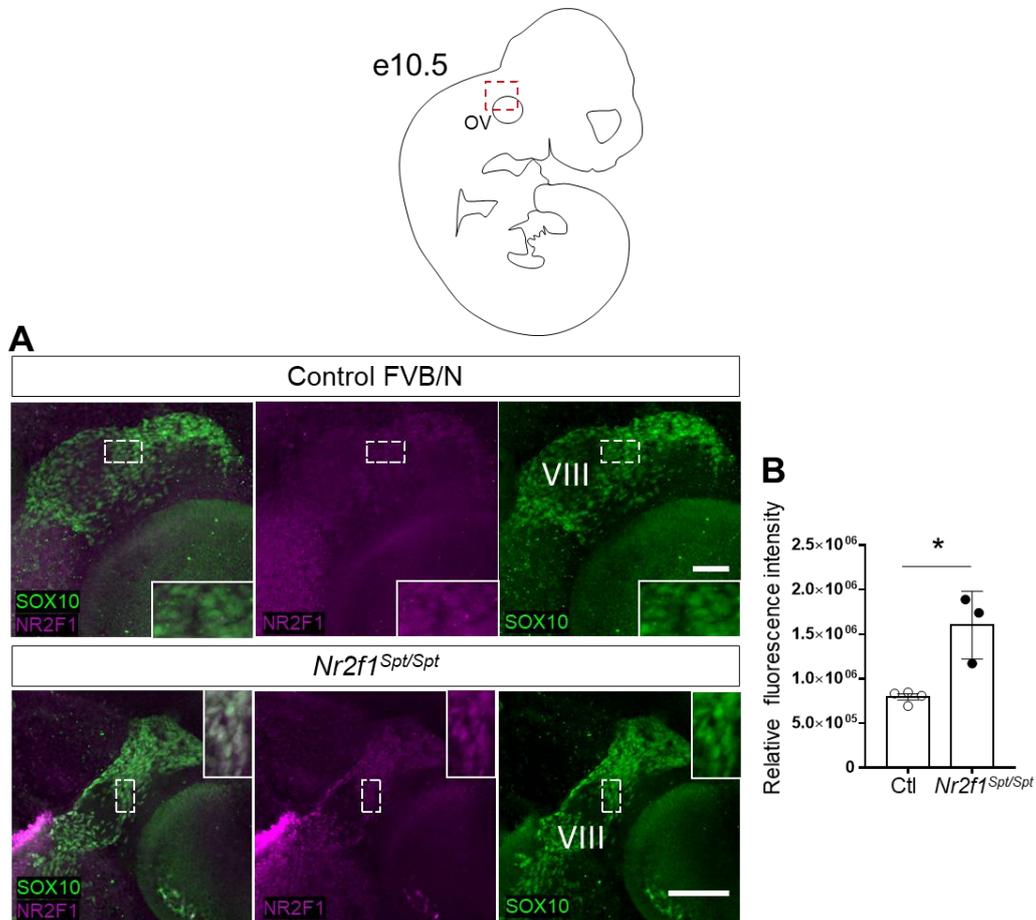


Figure S2. NR2F1 is only slightly overexpressed in *Nr2f1^{Spt/Spt}* cranial nerves. Whole mount immunostaining of e10.5 control FVB/N and mutant *Nr2f1^{Spt/Spt}* embryos using antibodies against NR2F1 and SOX10. SOX10-positive SCPs along the vestibulocochlear nerve slightly overexpress NR2F1 in mutants compared to controls. All displayed confocal images are z-stack projections representative of observations made from N = 3 embryos. OV, Otic Vesicle; VIII, vestibulocochlear nerve. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test. Scale bar, 200 μm.

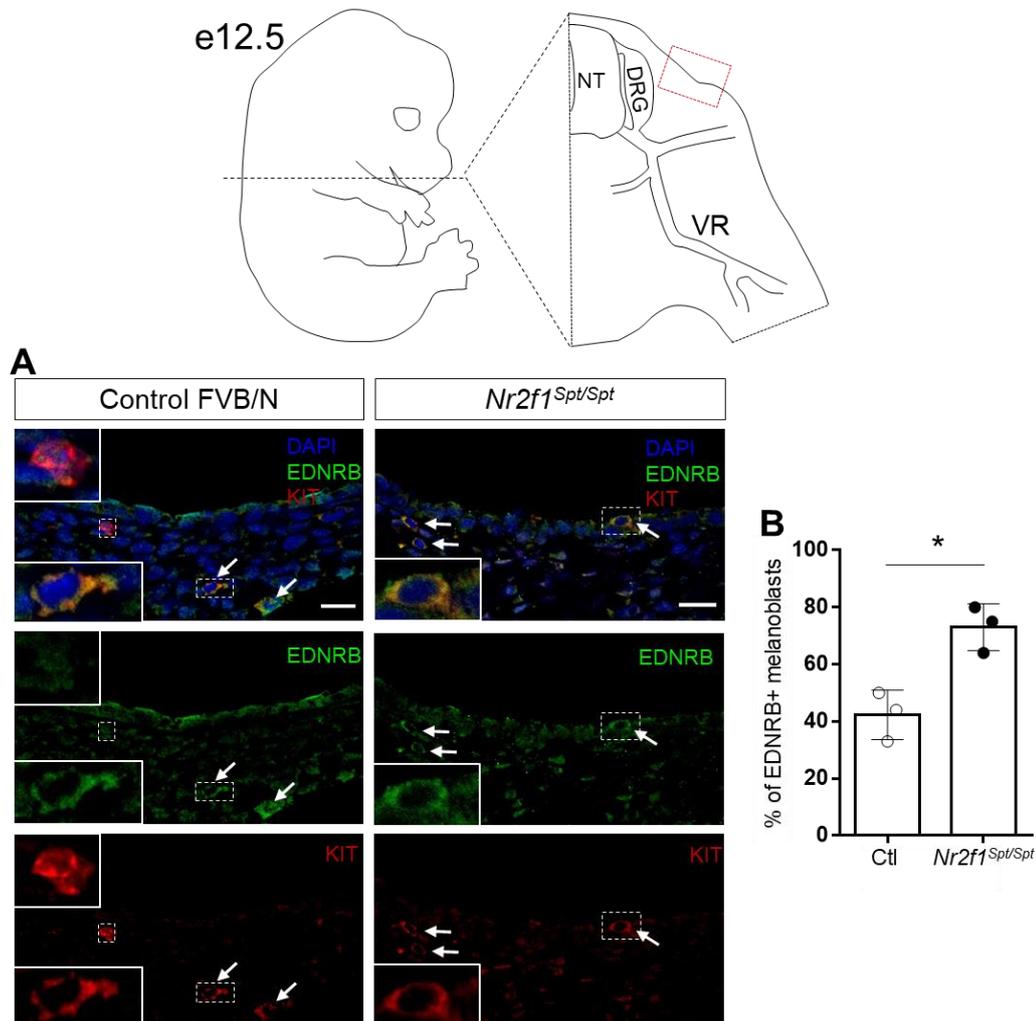


Figure S3. Abnormally high number of EDNRB+ melanoblasts in e12.5 *Nr2f1^{Spt/Spt}* embryos. (A-B) Immunofluorescence-based analysis of 20µm transverse sections of e12.5 embryos, taken from region indicated in the schematic representation at the top (NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; VR, ventral ramus). Control FVB/N and *Nr2f1^{Spt/Spt}* tissues were immunolabeled with antibodies against EDNRB and melanoblast marker KIT, and counterstained with DAPI. Representative confocal microscopy images are displayed on the left while accompanying quantitative analysis of double-positive cells is shown on the right. A higher proportion of KIT-positive NCC-derived melanoblasts express EDNRB in *Nr2f1^{Spt/Spt}* embryos (arrows). All displayed images are z-stack projections representative of observations made from N = 3 embryos. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test. Scale bar, 20µm.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le syndrome de Waardenburg de type IV est une maladie extrêmement rare. Sa très faible prévalence limite de manière importante le nombre de cas étudiés ainsi que l'intérêt global pour cette maladie. Entre les années 2011 et 2021, on dénombre une vingtaine d'études sur ce syndrome, dont une majorité se limite à des descriptions de patientes et patients (Pubmed) sans étude mécanistique. Il existe quelques modèles de souris pour l'étude de ce syndrome, mais elles se limitent à des mutations dans les exons des gènes les plus connus pour cette maladie : *Ednrb*, *Edn3* et *Sox10*, en faisant l'impasse sur une partie non négligeable et encore inconnue des causes de cette maladie (Pingault *et al.*, 2010). Étant donnée sa sévérité importante, lors d'étude de cas de syndrome de Waardenburg de type IV, l'emphase est souvent mise sur le mégacôlon aganglionnaire et ses causes plutôt que sur les défauts de pigmentation. Ainsi, ces travaux ont été les premiers à étudier spécifiquement le défaut de développement des mélanocytes dans cette maladie.

C'est en commençant par travailler sur le syndrome de Waardenburg de type IV, et en observant son impact différent sur les deux structures principales de l'oreille interne, qu'est née l'intuition d'une origine différente des mélanocytes de la cochlée et du vestibule. Cela a été validé grâce à l'utilisation du modèle *Dhh-Cre*, et ce malgré les précédentes publications suggérant qu'il ne fonctionnait pas pour l'étude de l'origine des mélanocytes. Il est donc très important de souligner le rôle essentiel de l'étude des maladies rares dans la découverte de nouveaux processus de développement.

Dans un second temps, l'étude de la souris *Spot* a permis de mettre en évidence le rôle essentiel du facteur *Nr2f1*. Son implication dans la différenciation précoce des cellules gliales entériques faisait de lui un candidat majeur dans la dérégulation du

développement des mélanocytes, mais jusqu'à présent aucune donnée ne montrait un lien entre *Nr2f1* et mélanocyte. Cette étude est donc la première à mettre la lumière sur ce lien, et à montrer un mécanisme original de dérégulation générale du développement des mélanocytes en faveur d'un destin cellules de Schwann. De manière intéressante, cela ne semble pas concerner les mélanocytes de la cochlée dérivés des PCS dont la colonisation de la vésicule otique semble débiter suffisamment tôt pour ne pas être impactée par la surexpression de *Nr2f1*. Cette étude soulève donc de nombreuses questions.

4.1 Les deux voies de migration des mélanocytes

Bien qu'elle ait fait l'objet d'une publication en 2009, la découverte des deux voies de migration des mélanocytes n'avait jusqu'à nos travaux, pas été appuyée par d'autres expériences. Ce travail de recherche a donc contribué à assoir l'existence de la voie de développement des mélanocytes à partir des précurseurs de cellules de Schwann. Il soulève en outre de nombreuses questions sur la nature et le rôle de ces deux populations de mélanocytes.

4.1.1 Les mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann DHH+.

Si la capacité des cellules de Schwann à se différencier en mélanocytes dans certaines conditions *in vitro* (Colombo *et al.*, 2020) n'est pas discutée, l'existence d'une voie de migration spécifique pour ce type de différenciation ne faisait pas encore l'unanimité (Mort *et al.*, 2015). Les principaux doutes à ce propos reposent sur plusieurs éléments.

4.1.1.1 La différenciation des PCS en mélanocytes.

Il a été montré à plusieurs reprises que des mélanoblastes expriment *Plp1* à différents stades de l'embryogenèse (Colombo *et al.*, 2012; Hari *et al.*, 2012), soulevant le doute sur un réel état PSC dans cette nouvelle voie de migration. Nos observations, cette fois-ci avec la lignée *Dhh-Cre*, montrent au contraire qu'à E12.5 les mélanoblastes proches du nerf sont négatifs pour la Cre, et n'expriment donc plus *Dhh* (Figure 2.2B), suggérant qu'ils ont terminé leur différenciation de PCS vers mélanoblaste. Cela n'exclut toutefois pas que les précurseurs de cellules de Schwann en cours de différenciation vers un stade mélanoblaste puissent exprimer, au même moment, à la fois des marqueurs de cellule de Schwann (PLP1) et des marqueurs de mélanoblastes (DCT dans ce cas).

Il a ensuite été soulevé qu'avec un système de traçage de lignée cellulaire tel que la souris *Plp1-Cre^{ERT}*, il n'est pas possible de faire la distinction entre une voie qui consisterait en des précurseurs de cellules de Schwann se différenciant en mélanocyte, et une voie qui consisterait en des mélanocytes exprimant des marqueurs de cellules de Schwann (Sommer, 2011). D'après la figure 2.2 A et B, les cellules de Schwann YFP+ situées plus en amont sur le nerf n'expriment pas encore de marqueur mélanocytaire, qui n'apparaissent dans certaines cellules que plus en aval. Ainsi, il semble que les cellules migrant le long des nerfs soient bien des précurseurs de cellules de Schwann et qu'elles acquièrent ou non une identité mélanocyte qu'après un certain temps ou une certaine distance de migration.

Toutefois se pose évidemment la question du dynamisme et du mécanisme de différenciation des précurseurs de cellules de Schwann en mélanocyte. En d'autres termes, à partir de quand les PCS futurs mélanocytes forment-elles une population distincte des PCS futures cellules de Schwann, et par quels mécanismes ?

Actuellement, peu de données existent à propos de la chronologie de ce processus et les voies signalétiques identifiées pour la différenciation des mélanocytes dérivés

des cellules de la crête neurale et des précurseurs de cellules de Schwann (Partie 1.2.4).

Pour répondre à la question chronologique, une expérience de microscopie confocale en direct (live imaging) sur des tranches d'embryons de souris double transgénique possédant les protéines recombinantes PLP1-GFP ou DHH-GFP et DCT-RFP pourrait permettre de suivre en temps réel le passage d'une identité PCS à mélanocyte.

Concernant les mécanismes, il pourrait être intéressant d'effectuer un séquençage sur cellule unique à partir de cellules YFP⁺ extraites d'embryons *Dhh-Cre*; *Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*. Cela permettrait d'obtenir les profils ARNm des PCS, et donc de savoir si des sous-populations existent parmi elles, mais aussi des PCS en cours de différenciation en mélanocytes et enfin des mélanocytes issus des PCS. À partir de ces données, des études complémentaires sur des lignées cellulaires de PCS pourraient permettre de comprendre encore plus précisément les mécanismes moléculaires en jeu dans cette différenciation.

Ainsi, il pourrait être intéressant, à partir des résultats mécanistiques obtenus, de développer de nouveaux protocoles de différenciation pour les deux voies PCS et NCC. Cela pourrait permettre de générer des mélanocytes issus de l'une ou l'autre de ces voies en particulier.

4.1.1.2 La particularité du modèle *Dhh-Cre* dans les précédentes études.

L'impossibilité de confirmer l'existence de mélanocytes dérivés de précurseurs de cellules de Schwann avec une autre lignée, à savoir la lignée *Dhh-Cre*, a accentué le doute sur l'existence de cette voie de migration (Jaegle *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2006). Cela est particulièrement évident dans la publication de Wong *et al* qui montrent que bien que des cellules non pigmentées SOX10⁺ situées dans le bulge du follicule pileux sont bien dérivées de cellules ayant exprimé *Dhh* (Figure 1.17),

comme dans la figure 2.1D de ce manuscrit, mais chez Wong *et al* aucun mélanocyte mature de la base du poil ne semble positif à ce même marquage. Une première explication à cette différence peut être le type de rapporteur utilisé. En effet, Wong *et al* utilisent la lignée de souris *Dhh-Cre* couplée à une lignée rapportrice *Rosa26^{FloxSTOP-LacZ}*. Lorsqu'activée par la Cre recombinase, la β -galactosidase codée par *LacZ* est capable d'hydrolyser le Xgal en 5 5'-dibromo-4 4'-dichloro-indigo, un composé bleu. Cette expérience nécessite donc une étape enzymatique pour la détection, ce qui peut être à l'origine d'une moindre sensibilité. À l'inverse, l'utilisation d'une lignée *Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* permet la détection immédiate -avant fixation au paraformaldéhyde- du fluorophore (Figure 2.1K). Cela pourrait donc expliquer la différence de détection observée entre ces deux expériences. Ensuite, un élément important à prendre en compte est la différence de fond génétique. Toutes les expériences de Wong *et al* sont réalisées avec des lignées de souris issues d'un fond génétique C57/BL6 dont le pelage est pigmenté, alors que nos expériences sont réalisées avec des lignées de souris issues d'un fond génétique FVB/N albinos. Or, on sait qu'il peut exister des différences comportementales (Ozburn *et al.*, 2010), mais aussi physiologiques entre différents fonds génétiques (Davie *et al.*, 2007). De plus, il n'est pas vraiment très adéquat d'utiliser une lignée de souris dont les mélanocytes sont pigmentés en noir avec un marquage de ces derniers en bleu. Enfin, sachant que le bulge contient des cellules souches de mélanocytes et des kératinocytes (Osawa *et al.*, 2005), et que seuls les premiers expriment le marqueur SOX10 (Uhlen *et al.*, 2015), le marquage bleu de cellules SOX10+ dans le bulge suggère très fortement que ce sont des CSM, futurs mélanocytes matures, qui sont donc dérivés de précurseurs de cellules de Schwann ayant exprimé *Dhh*, et que l'absence de marquages des mélanocytes matures pigmentés est dû à un des éléments soulevés précédemment.

4.1.2 Homogénéité dans la répartition des mélanocytes de la peau dérivés des PCS

Lorsque l'on observe un schéma des deux voies de migration des mélanocytes (Figure 1.12), on peut facilement s'imaginer que la voie de migration dorsolatérale des dérivés des cellules de la crête neurale est particulièrement efficace pour permettre une colonisation de toute la partie dorsolatérale de l'embryon en développement, alors que la voie dorso-ventrale des dérivés des précurseurs de cellules de Schwann semble être le chemin le plus court pour coloniser sa partie ventrale. On pourrait ainsi s'attendre à une répartition hétérogène des mélanocytes. Pourtant, un comptage du nombre de mélanocytes dérivés de PCS au niveau du dos et du ventre (Figure 2.1A) indique qu'il n'existe pas de différence significative de répartition de ces derniers (Figure 2.1I). Chez le poulet, il a été montré que, suivant les deux vagues successives, d'abord de la voie dorsolatérale, puis de la voie ventrale, une troisième vague de mélanoblastes apparaissait à partir de nerfs émergeant du ganglion de la racine dorsal et se dirigerait cette fois vers la partie dorsale de l'embryon (Adameyko *et al.*, 2009). Ces mélanoblastes dérivés de PCS colonisent les zones dorsales de l'embryon. On peut émettre l'hypothèse que le même processus a lieu chez la souris, et que les mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann colonisent aussi la partie ventrale de l'embryon, ce qui pourrait expliquer la proportion similaire de mélanocytes dérivés de PCS au niveau du ventre et du dos. Toutefois, étant donné la mise en lumière de différence entre la migration des mélanocytes au niveau du tronc et au niveau du crâne, il pourrait être intéressant de vérifier si cette homogénéité antéro-postérieure est aussi crânio-caudale. Pour cela il suffirait de reproduire les expériences sur la peau contenues dans le Chapitre II, mais cette fois-ci en prélevant des tissus au niveau du crâne, du dos et du bassin.

4.1.3 L'importante proportion des mélanocytes dérivés des PCS.

Dans la première publication mettant en évidence une origine gliale des mélanocytes, Adameyko *et al.* estiment à $65.9 \pm 3.1\%$ la proportion de mélanocytes folliculaires dérivés de PCS sans distinction de compartiment. De notre côté, nous

avons trouvé respectivement dans le bulbe et le bulge ; $89.8\% \pm 1.1\%$ et $87.8\% \pm 4.5\%$ de mélanocytes dérivés de PCS (Figure 2.1J). Cette différence d'environ 25% avec la publication de Adameyko *et al.* peut s'expliquer par le fait qu'eux utilisent une lignée de souris inductible au tamoxifène, avec le risque que l'induction ne soit pas totale, alors que notre lignée Cre-*loxP* constitutive n'a pas ce problème, et met en évidence la totalité des cellules ayant exprimé *Dhh*.

Dans la peau, cette proportion de mélanocytes dérivés de PCS, que ce soit celle proposée par Adameyko *et al.* ou la nôtre, peut paraître importante pour une voie indirecte qui passe par un stade intermédiaire avant d'atteindre l'état mélanoblaste. À l'inverse, lorsque l'on observe d'autres organes, tels que le cerveau ou le vestibule (Figure 1.16 et Figure 2.3) (Bonnamour *et al.*, 2021; Kaucka *et al.*, 2021), on peut observer un inversement de la proportion des mélanocytes selon leur origine. Puisque l'étude de ces deux voies de migrations n'en est qu'à ses débuts, il est difficile de donner une explication sur la raison de cette différence d'origine des mélanocytes en fonction des organes.

Toutefois, cette proportion déséquilibrée de mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann dans la peau suggère une différence dans la capacité de colonisation et/ou de prolifération entre ces deux voies de migration. Ainsi, la question se pose de savoir par quel processus les mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann finissent par être en plus grand nombre que les dérivés directement des cellules de la crête neurale dans la peau. L'étude de la capacité de migration, survie et prolifération de ces deux populations pourrait apporter un éclairage à cette question. Cela pourrait se faire *in vivo* par l'utilisation de différent marqueur (Ki67 et essai EdU par exemple), mais aussi *in vitro* en effectuant par exemple des tests de migration cellulaire (scratch test) sur des mélanocytes directement dérivés de cellules de la crête neurale, et d'autres de précurseurs de cellules de Schwann.

De plus, ces différences importantes d'origines selon les organes (Figure 1.16 et Figure 2.3) (Bonnamour *et al.*, 2021; Kaucka *et al.*, 2021) peuvent laisser penser qu'il pourrait exister des différences de fonctions selon l'origine des mélanocytes. Il pourrait ainsi être intéressant de récolter les différents organes et en extraire les mélanocytes par tri cellulaire des cellules DCT-GFP. Une caractérisation poussée des populations par séquençage sur cellule unique par exemple, pourrait permettre de mettre en évidence de potentielles différences dans l'expression de certains gènes. En plus d'apporter une information sur les potentielles différentes fonctions des mélanocytes selon leurs origines, cela pourrait aider à comprendre la fonction globale de ce type cellulaire dans certains organes tels que le cerveau ou le cœur, pour lesquels cela n'est pas encore très clair (Kaucka *et al.*, 2021).

4.1.4 La répartition spatiale des mélanocytes de l'oreille interne.

Un des éléments importants de ces travaux est la mise en évidence d'une ségrégation spatiale des mélanocytes de l'oreille interne selon leur origine. Bien qu'ils remplissent tous la même fonction, à savoir maintenir la composition en ions potassium du liquide endolymphatique (Figures 1.7, 1.8), les mélanocytes du vestibule sont très majoritairement dérivés des cellules de la crête neurale alors que les mélanocytes de la cochlée sont très majoritairement dérivés des précurseurs de cellules de Schwann. Cela soulève plusieurs questions, et tout d'abord, la cause initiale de cette ségrégation, à savoir pourquoi pour un même organe qu'est l'oreille interne, l'approvisionnement en mélanocyte serait différent selon qu'il concerne le vestibule ou la cochlée ? Cela pourrait être dû à l'apparition plus précoce du vestibule dans l'histoire du vivant (Zhu *et al.*, 2020), semble-t-il, avant la cochlée, et qui aurait donc pu se voir attribuer la voie de migration la plus « basique » à savoir directement dérivée de cellules de crête neurale, alors que l'arrivée plus tardive de la cochlée aurait pu être associée à l'apparition de la seconde voie de migration le long des nerfs. Cette question ne pourra malheureusement être résolue qu'au gré des nouvelles découvertes de fossiles.

Une autre interrogation que cette découverte soulève est l'homogénéité ou non de ces populations. En effet, si elles ont toutes les deux pour rôle le maintien de la composition du liquide endolymphatique, il semble que les mélanocytes de la cochlée jouent en plus un rôle contre les espèces réactives de l'oxygène (Helzner *et al.*, 2005) qui n'a pas été étudié dans le vestibule. Étant données leurs origines différentes, il pourrait être intéressant de comparer les fonctions de ces deux populations, par exemple dans leur capacité à synthétiser de la mélanine ou à transporter des ions. Cela pourrait être effectué *in vitro*, après récupération des mélanocytes à partir de tissus dissociés de souris DCT-GFP par exemple. Il existe des organes sur puce, capable de reproduire des épithélium basiques permettant de mimer le fonctionnement d'un organe comme les poumons (Wu *et al.*, 2020). Il pourrait être intéressant de reproduire ce système avec des mélanocytes récupérés de la cochlée et du vestibule et d'en mesurer les différents paramètres fonctionnels. La mélanine, qui joue un rôle antioxydant dans le traitement des espèces réactives de l'oxygène, pourrait quant à elle être dosée par spectrométrie (Dwyer *et al.*, 1998).

4.1.5 Implication des mélanocytes dans la réparation de la peau.

La peau est le premier organe visible lors d'une interaction sociale. Souvent source d'oppression (Fanon, 1952), de honte (Petit, 2012), parfois de fierté (Bruneel et Gomes Silva, 2017; James Brown, 1968), la couleur de la peau est une composante majeure d'un grand nombre de phénomènes sociaux. Malheureusement, elle entre, de manière consciente ou non, dans les critères de classification d'une personne selon son origine, son niveau social, sa santé et sa beauté. Ainsi la peau, et particulièrement sa couleur, est un élément essentiel dans les processus de socialisation, et nécessite qu'on s'y intéresse à la hauteur de cet enjeu.

En plus de Syndrome de Waardenburg-Shah étudié ici, une grande variété de troubles peut porter atteinte à l'intégrité et à la couleur de la peau, et provoquer des troubles psychologiques importants (Grimes et Miller, 2018; Ramakrishna et Rajni, 2014).

4.1.5.1 Vitiligo

Cette maladie auto-immune assez répandue (Zhang *et al.*, 2016) provoque la dépigmentation d'abord partielle puis parfois totale de la peau. Elle est due à l'attaque des mélanocytes par le système immunitaire. Il existe des modèles murins pour cette maladie (Riding *et al.*, 2019), mais les effets de cette maladie sur les deux populations de mélanocytes de la peau n'ont jamais été étudiés. En effet, il pourrait être intéressant de comparer la résistance de mélanocytes dérivés directement des cellules de la crête neurale avec celle de ceux dérivés des précurseurs de cellules de Schwann. Cela peut être réalisé en associant un modèle de souris vitiligo à un modèle rapporteur *Dhh-Cre* pour la récupération des mélanocytes précurseurs de cellules de Schwann et un autre permettant la récupération des mélanocytes totaux tel que *Dct-Rfp*. En récupérant, à partir de prélèvements de peau, les mélanocytes par tri cellulaire, il serait ainsi possible de quantifier, à différents stades de la maladie, leurs nombres et la proportion des mélanocytes de chacune des origines.

De même, il pourrait être intéressant de comparer les capacités régénératives de ces deux populations de mélanocyte, puisque la greffe de ces derniers est un des traitements possibles pour cette maladie (Zokaei *et al.*, 2019). Les mélanocytes précédemment isolés pourraient ainsi être remis en culture et réimplantés chez les souris atteintes de Vitiligo. Le niveau de rétablissement de pigmentation pourrait alors être comparé selon que les mélanocytes ont une origine cellules de crête neurale ou PCS.

4.1.5.2 Les mélanocytes et la cicatrisation.

Il a été démontré qu'après la naissance, les mélanocytes ne participent pas directement au processus de cicatrisation de la peau (Parfejevs *et al.*, 2018). Toutefois, dans la plupart des plaies légères comme les brûlures au premier degré, les mélanocytes finissent par recoloniser la peau et rétablir la pigmentation. Il pourrait être intéressant d'étudier si ces mélanocytes appartiennent à une population

plutôt qu'à une autre, et si cela pourrait être dû à une capacité accrue de colonisation. Cela pourrait être adressé en récoltant, à l'aide d'une combinaison de souris *Dhh-Cre* ; *Rosa26R-YFP* et *Dct-Rfp* les mélanocytes à différents stades de la repigmentation de la peau après une coupure, afin de comparer les proportions de chacune des populations. Si ceci était démontré, ce serait un premier pas important pour tester des greffes à partir de populations spécifiques de mélanocytes.

4.1.5.3 Le mélanome

Le cancer de la peau est la forme la plus commune en Amérique du Nord. Dans environ 5% des cas (Ward WH, 2017), ce cancer est un mélanome, la forme la plus létale des cancers de la peau.

Cette maladie peut avoir des causes génétiques, via la transmission de mutation dans les gènes *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* et *TERT* par exemple (Read *et al.*, 2016), ou des causes externes via l'exposition aux ultraviolets (Sample et He, 2018) ou à des produits chimiques (Dika *et al.*, 2010). Elle se caractérise par une prolifération anormale des mélanocytes au détriment des cellules voisines, avec parfois des métastases dans d'autres organes.

À ce jour, aucune étude n'a été faite concernant la potentialité des différentes populations de mélanocyte à générer un mélanome. Pourtant, une des stratégies modernes de traitement du cancer est le ciblage de type cellulaire particulier en utilisant des anticorps monoclonaux. Ainsi, une meilleure connaissance des potentiels sous-types de mélanocytes impliqués dans les mélanomes pourrait aider à lutter contre cette maladie.

Pour cela, il pourrait être intéressant d'utiliser des souris génétiquement modifiées pour développer un mélanome, telles que les souris *Skunk* (Pilon, 2016), généré par la même méthode que la souris *Spot* (Figure 1.20). Ces souris développant un cancer pourraient être couplée à des souris rapportrices pour la détection des différentes

origines des mélanocytes. Dans le cas d'une surreprésentation d'une population de mélanocytes par rapport à une autre, il pourrait être intéressant dans un second temps de tenter de développer des thérapies. Évidemment, cela ne peut être envisagé que si les caractéristiques particulières de chacune de ces populations sont connues, et donc si les études suggérées dans les paragraphes précédents ont déjà été effectuées.

4.2 Le développement des mélanocytes dans le syndrome de Waardenburg de type IV.

Il n'est pas le symptôme le plus grave de cette maladie, mais la perte de pigmentation peut représenter un handicap social important pour les patientes et patients atteints du syndrome de Waardenburg de type IV. Cette étude est la première à se pencher plus particulièrement sur cette caractéristique de la maladie.

S'il arrive que la mutation de certaines enzymes clés dans la synthèse de la mélanine puisse entraîner des formes particulières d'albinisme (Dolinska *et al.*, 2014), ce n'est pas le cas dans le syndrome de Waardenburg dont le symptôme de dépigmentation est dû à l'absence de mélanocytes (Figure 3.1C et D).

Dans notre modèle de souris *Spot*, ce processus qui mène à cette absence est particulièrement original, puisqu'il touche les deux voies de migration dans des conditions différentes, mais avec un socle commun, à savoir la favorisation d'un destin cellule de Schwann par rapport aux mélanocytes. Etant donnée les différentes intersections existantes entre les voies de signalisation pour la différenciation des CS et des mélanocytes (Figures 1.10, 1.13, 1.14, Partie 1.2.4), cette étude pourrait être répliquée dans les autres modèles murins pour cette maladie, afin de voir si le cas des souris *Spot* est particulier ou s'il représente un phénomène propre à tous les sous-types de syndrome de Waardenburg de type IV, quels que soit le gène atteint.

4.2.1 La voie de migration dérivée des cellules de la crête neurale

Au niveau de cette voie, il a été mis pour la première fois en évidence *in vivo* un phénomène de différenciation de mélanocytes en cellules de Schwann au niveau de l'épiderme (Figure 3.2 et 3.3). Si le processus était déjà connu et contrôlé *in vitro* (Dupin *et al.*, 2000), cette observation *in vivo* ouvre de nouvelles perspectives sur les capacités de différenciation des mélanocytes.

Il reste malgré tout de nombreuses expériences à réaliser pour en comprendre davantage à ce sujet. Par exemple, il serait intéressant de connaître le stade de différenciation des mélanoblastes/mélanocytes susceptibles de se différencier en cellules de Schwann, et s'il existe un point de contrôle à partir duquel cette différenciation n'est plus possible. Cela pourrait être étudié en utilisant la lignée de souris *Spot* et en traçant les mélanoblastes/mélanocytes à l'aide de marqueurs de maturation des mélanocytes tels que DCT, PAX3, TYRP1, TYR ou MC1R (Figure 1.13). Ensuite, il pourrait être instructif de vérifier si les cellules de Schwann générées à partir de mélanocytes chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}* sont de même nature que les autres cellules de Schwann. Pour cela, il suffirait de disséquer la peau et les nerfs des embryons de ces souris couplées à des rapportrices *Plp1-Gfp* et en extraire les cellules de Schwann. Ainsi il pourrait être possible de comparer par séquençage ARN par exemple, les cellules de Schwann de la peau dérivées de mélanocytes et les cellules Schwann myélinisantes des nerfs directement dérivées de cellules de crête neurale.

Enfin, dans la perspective de développements thérapeutiques contre ce symptôme, une étude sur la capacité à bloquer cette différenciation pourrait être menée. En extrayant les mélanocytes de la peau d'embryons *Nr2f1^{Spt/Spt} ; Dhh-Cre; Rosa26^{FloxSTOP-YFP}*, il pourrait être possible de tenter d'empêcher leur différenciation en cellules de Schwann en les mettant en contact de différentes substances. Ainsi, des facteurs, tels que EDN3 ou BMP4, qui aide à la différenciation des mélanocytes

(Lahav *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 2020), pourrait forcer une destinée mélanocytes plutôt que Schwann. De plus, une étude plus approfondie des cibles de NR2F1 dans le modèle de souris *Spot* pourrait aider à trouver des molécules capables de compenser l'effet de sa surexpression.

4.2.2 La voie de migration des précurseurs de cellule de Schwann.

Au niveau de cette voie, c'est l'impossibilité pour les précurseurs de cellules de Schwann à se différencier en mélanocyte qui provoque la déplétion de ces derniers.

Pour commencer, la question se pose de savoir si dans les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*, les précurseurs de cellules de Schwann qui ne sont pas devenus des mélanocytes sont différents ou non des autres précurseurs de cellules de Schwann. Il est possible d'étudier cela en récupérant les cellules autour des nerfs de souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*; *Dhh-Gfp* et *Dhh-Gfp* puis en effectuant un séquençage sur cellule unique de ces populations. S'il s'avère que les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}* présentent une population GFP+ supplémentaire par rapport aux contrôles, cela pourrait suggérer l'existence d'une population de cellule de Schwann de nature distincte, car sensée s'être différenciée en mélanocytes. Par la suite, il pourrait être intéressant de tenter de forcer la différenciation de ces cellules en mélanocyte. *In vivo*, il a déjà été montré dans des souris *ErbB3^{-/-}*, que les précurseurs de cellules de Schwann se différencient davantage en mélanocyte que dans des souris contrôles (Adameyko *et al.*, 2009). De ce fait, il serait intéressant de croiser les souris *Spot* avec le modèle *ErbB3^{-/-}* afin de voir s'il est possible de rétablir la différenciation des précurseurs de cellules de Schwann en mélanocytes. Cela donnerait en outre, un indice sur la voie de signalisation impliqué dans le mode d'action de NR2F1 chez *Spot*. Enfin, *in vitro*, il pourrait être intéressant, à partir des cellules récupérées sur des nerfs de souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*; *Dhh-Gfp*, de les mettre en contact avec différentes molécules perturbant la voie ERBB3 telles que des inhibiteurs de la voie mTORC1/2 (Beauchamp *et al.*, 2021).

4.3 Le facteur NR2F1 et son rôle dans la différenciation des cellules de Schwann

NR2F1 a un rôle essentiel dans la différenciation des oligodendrocytes (Naka *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2004), un sous type de cellule gliale du système nerveux central proche des cellules de Schwann du fait de sa fonction, et qui partage avec elles certains marqueurs, tels que MBP ou PLP1. Il paraît de plus en plus probable que NR2F1 joue aussi un rôle au niveau des cellules de Schwann du système nerveux périphérique. Tout d'abord, à e12.5, l'expression de NR2F1 par les précurseurs de cellules de Schwann migrant le long des nerfs des souris *Nr2f1^{Stp/Stp}*, mais aussi des souris contrôles, (Figure 3.4 B-D) suggère que ce facteur pourrait jouer un rôle dans le développement de ces cellules. De plus, le modèle *Spot* a permis de mettre en évidence qu'une surexpression de *Nr2f1* déclenche une différenciation précoce des cellules de crête neurale du système nerveux antérieur en cellules gliales entériques (Bergeron *et al.*, 2016), un sous-type de cellules gliales comme le sont les cellules de Schwann. Enfin, la proximité des sites de fixations à l'ADN de NR2F1 et SOX10 (Lopez-Anido *et al.*, 2016), ainsi que le rôle de ce dernier dans la différenciation des cellules de Schwann (Figures 1.10, 1.14), peut mener à l'hypothèse d'une action conjointe entre SOX10 et NR2F1 pour le déclenchement de l'expression de gènes en faveur d'une différenciation en cellule de Schwann (Figure 1.14). Toutefois, SOX10 joue aussi un rôle dans le développement des mélanocytes (Figures 1.10, 1.13). Il s'agirait donc de comprendre pourquoi, si NR2F1 fonctionne bel et bien en synergie avec SOX10, l'augmentation de l'expression de *Nr2f1* chez *Spot* oriente vers un destin Schwann plutôt que mélanocyte. Cela pourrait être élucidé en étudiant la dynamique et la répartition spatiale de l'expression de *Nr2f1*. En effet, il est intéressant de constater que cette expression n'est observable ni chez les souris contrôles ni chez les souris *Spot* au niveau des nerfs glossopharyngien (IX), vagal (X) et facial (VII) à e10.5 (Figure 3.7), c'est-à-dire lorsque les mélanocytes sont déjà en cours de colonisation de la vésicule otique (Figure 1.19). 48h plus tard en revanche, on observe une expression au niveau des nerfs du tronc (Figure 3.4). Cela suggère que l'expression

de *Nr2f1* n'est pas constante au cours du temps, mais qu'il pourrait agir dans un cadre spatio-temporel précis. Il pourrait en être de même pour SOX10 dont l'activation pourrait être spatialement et temporellement contrôlée pour orienter à un certain temps et dans un certain endroit vers un destin Schwann, et à un autre temps et endroit vers un destin mélanocyte.

Pour élucider cette question, il pourrait être bon d'effectuer une RT-qPCR de *Nr2f1* sur des cellules triées à partir d'embryon *Dhh-Gfp* pris toutes les 6h ou 12h entre e9 et e12.5, en séparant à chaque fois le crâne du tronc.

Une fois la temporalité de l'expression de NR2F1 connue, si elle est définie précisément dans le temps, il sera possible d'étudier le mécanisme de fonctionnement de ce facteur en effectuant une expérience de séquençage sur fragments immunoprécipités par immunoprécipitation chromatique (ChIP-Seq) sur des cellules triées à partir d'embryon *Mpz-Cre, Rosa26RYFP* (Feltri, M L *et al.*, 1999), pour en récupérer les cellules de Schwann, au temps où *Nr2f1* est à son niveau maximal d'expression séparément dans le tronc et dans le crâne. Ainsi, il pourrait être possible de mettre en évidence la potentielle synergie avec SOX10 et l'effet de cette action combinée sur d'autres molécules importantes telles que MITF ou PAX3 (Bondurand *et al.*, 2000), ou encore des voies de signalisation telles que WNT (Dorsky *et al.*, 1998) et EDNRB/EDN3 (Kaucka *et al.*, 2021).

Concernant le système nerveux central, la même expérience pourrait être réalisée en utilisant cette fois-ci un modèle permettant de récupérer les oligodendrocytes, telle qu'une souris OLIG2-EGFP (Doyle, Joseph P *et al.*, 2008).

Une fois le mode d'action de NR2F1 connu, à savoir ses gènes cibles et les cascades de signalisation en jeu, il sera possible de se servir de ces informations pour tenter de contrebalancer le phénotype *Spot* lié au syndrome de Waardenburg de type IV en stimulant des processus opposés au mode d'action de NR2F1. Selon le même

principe, il sera possible de tester des voies d'activation parallèle à NR2F1 pour chercher de potentielles pistes thérapeutiques à la BBSOA, caractérisée par une mutation déplétant les fonctions de NR2F1.

4.4 La population cellulaire du follicule.

Lors de la formation des follicules, une population homogène de cellules KIT+ cõlonise ce dernier et se répartit entre deux localisations : en dessus et en dessous de la ligne de Auber (Figure 1.5) (Peters *et al.*, 2002). La différence entre ces deux populations n'avait jusqu'à récemment jamais été étudiée si bien qu'il a semblé acquis que toutes ces cellules étaient des mélanocytes, différenciés pour ceux au-dessus et indifférenciés pour ceux en dessous de la ligne de Auber (Liao *et al.*, 2017; Zocco et Blanpain, 2017). Pourtant le traçage des mélanocytes en utilisant des systèmes Cre-*loxP* tels que *Dct-Cre/R26R* sensé marquer tous les mélanocytes (puisque *Dct* est exprimé par les mélanoblastes au cours du développement) ne permet pas de marquer la population cellulaire sous la ligne de Auber (Wong *et al.*, 2006). De même, lors de la mise en évidence de l'existence de dérivés de précurseurs de cellules de Schwann par l'utilisation du couple *Plp1-Cre/R26R*, seuls les mélanocytes matures de la base du poil semblaient marqués et aucun marquage n'était visible autour de la papille dermique (Adameyko *et al.*, 2009). Enfin, nos résultats de traçage des mélanocytes dérivés des précurseurs de cellules de Schwann ayant exprimé *Dhh* (Figure 3.1D) confirment que la population KIT+ autour de la papille dermique ne semble pas être un état intermédiaire entre CSM et mélanocyte mature. Ainsi tous ces résultats semblent indiquer que cette population, pour le moment non caractérisée, pourrait être d'une autre nature que ce qui était suggéré initialement.

Pour caractériser cette population, il sera intéressant d'effectuer un séquençage ARNm sur cellule unique afin de pouvoir la distinguer des mélanocytes matures et des CSM. La difficulté est ici de récolter suffisamment de cellules d'intérêt, puisque

les cellules KIT⁺ du follicule sont peu nombreuses comparées aux autres cellules de la peau. Ainsi une première expérience n'a pas permis de récolter suffisamment de cellules pour déterminer une identité précise pour les cellules KIT⁺ seules (Annexe 1). Il faudrait donc réitérer cette expérience en tentant d'enrichir l'échantillon en cellules d'intérêt, soit mécaniquement par une sélection méticuleuse des follicules, soit par optimisation du marquage à l'aide de l'anticorps KIT-PE.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif général de cette thèse était d'étudier le développement des mélanocytes chez *Spot*, un modèle de souris pour le Syndrome de Waardenburg de type IV. Le premier objectif a été de trouver des outils fiables pour étudier le développement des mélanocytes, puis de les utiliser pour tracer l'origine des mélanocytes de l'oreille interne. Enfin, ces outils ont permis dans un second temps d'étudier l'effet de la mutation *Spot* sur le développement des mélanocytes.

Cette thèse prend racine à partir de la première publication caractérisant le modèle *Spot* (Bergeron *et al.*, 2016). Cette dernière s'est principalement intéressée au mégacôlon aganglionnaire, mais a permis de mettre en évidence trois phénomènes primordiaux pour la construction de ce projet : la perte de pigmentation à l'état homozygote, l'absence de mélanocyte dans le vestibule (contrairement à la cochlée) et enfin la surexpression de NR2F1. Le premier défi a été de trouver un outil capable de tracer l'origine des mélanocytes. Face à la difficulté à faire fonctionner la souche *Plp1-Cre^{ERT2}* qui était alors la seule lignée utilisée pour tracer l'origine des mélanocytes, il a fallu valider un nouveau modèle *Dhh-Cre* dont de précédents résultats suggéraient qu'il ne fonctionnerait pas. Contre toute attente, nous avons réussi à faire fonctionner cette lignée pour tracer l'origine des mélanocytes. En plus d'affiner la mesure des quantités de mélanocytes de la peau et des poils dérivés des deux voies de migration, cela a permis de mettre en évidence l'origine différente des mélanocytes de la cochlée et du vestibule, respectivement dérivés des PCS et des cellules de crête neurale.

Une fois cet outil validé, il a offert la possibilité d'aller explorer, chez la souris *Spot*, les différentes perturbations du développement des mélanocytes. Cela a permis de mettre en évidence qu'au niveau du tronc, les voies de développement des mélanocytes sont réorientées vers un destin CS, alors qu'au niveau du crâne, seule la voie de migration dérivée directement de cellules de crête neurale est atteinte,

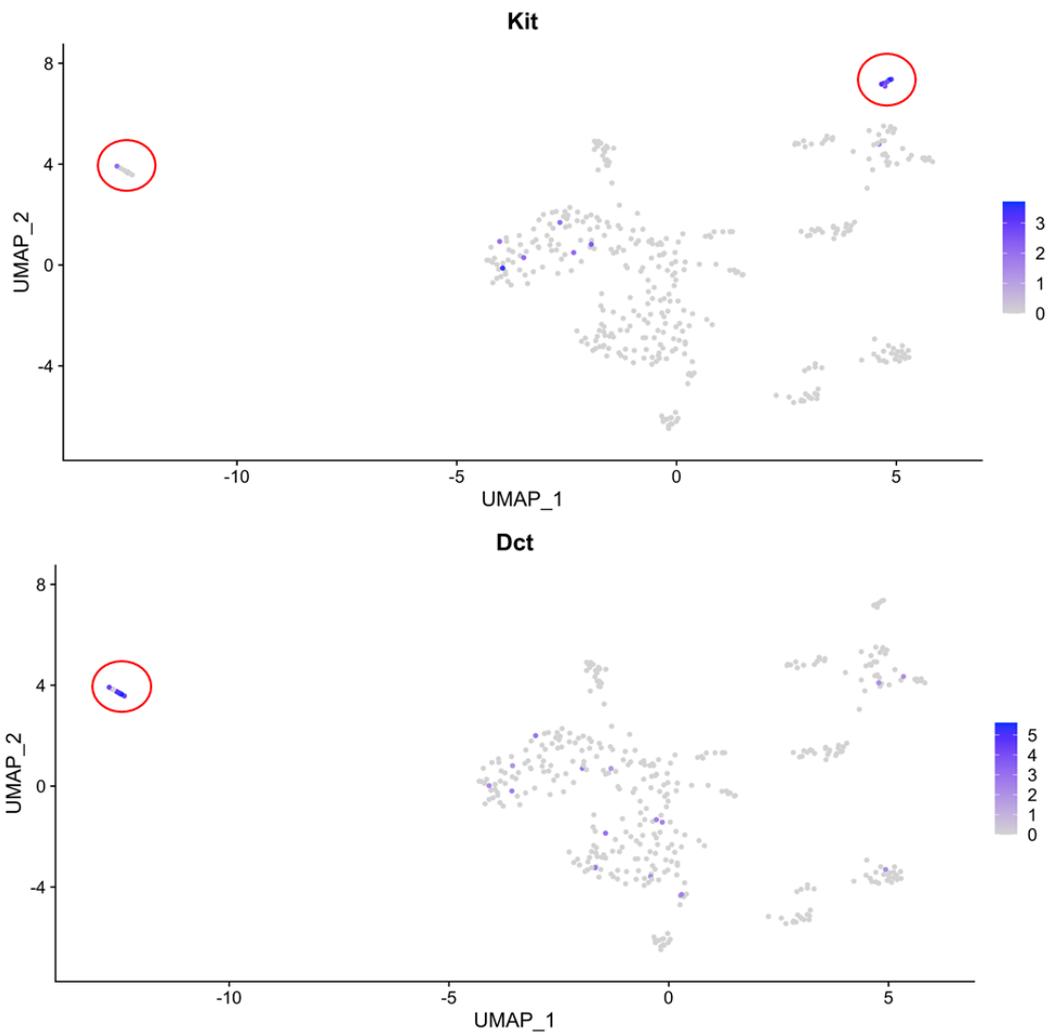
permettant ainsi le maintien de l'approvisionnement de la cochlée en mélanocytes dérivés des PCS.

Ces travaux ont aussi permis de mettre en évidence le rôle important du facteur de transcription NR2F1 dans le processus de différenciation des PCS. En effet ce dernier semble être un facteur important de ce processus, permettant de maintenir des PCS dans la voie CS, mais pouvant aller jusqu'à dédifférencier des mélanocytes pour les orienter dans une voie CS.

Ensemble, ces travaux apportent un nouvel éclairage sur le syndrome de Waardenburg de type IV, et plus particulièrement sur les défauts associés au développement des mélanocytes. Ils ouvrent ainsi de nouvelles voies pour de futures recherches, particulièrement sur le mode de fonctionnement de NR2F1. Enfin, ces découvertes pourraient mener à l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques.

ANNEXE A

RESULTATS PRELIMINAIRE DE SEQUENÇAGE ARNm SUR CELLULES UNIQUES DE FOLLICULES PILEUX.



Résultat de séquençage ARNm sur cellule unique d'un follicule pileux.

APPENDICE A

AMPK AND AUTOPHAGY CONTROL EMBRYONIC ELONGATION AS PART OF A RHOA-LIKE MORPHOGENIC PROGRAM IN NEMATODE

SMALL GTPASES
2020, VOL. 11, NO. 3, 186-193
<https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1372868>

**AMPK and autophagy control embryonic elongation as part of a RhoA-like morphogenic program in nematode**

Emmanuel Martin <https://orcid.org/0000-0003-3878-8633>[†], Grégoire Bonnamour <https://orcid.org/0000-0002-2398-858X>[†], and Sarah Jenna

Integrative Genomics and cell signaling laboratory, Chemistry-Biochemistry Department, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montreal, Canada

ABSTRACT

Autophagy is the process where cytosolic components are digested by the cell. This process is required for cell survival in stressful conditions. It was also shown to control cell division and more recently, cell morphology and migration. We characterized signalling pathways enabling embryonic epidermal cells of the nematode *Caenorhabditis elegans* to elongate along their antero-posterior axis. Previous studies revealed that epidermal cells can adopt either a RhoA-like or a Rac1-like morphogenic program. We show here that the AMP-activated protein kinase (AMPK) and genes controlling autophagy are required for proper elongation of epidermal cells following the RhoA-like program and are dispensable for other cells. This suggests that AMPK-autophagy is used by the embryo to fuel the most energy-demanding morphogenic processes promoting early elongation.

ARTICLE HISTORY

Received 23 March 2017
Revised 22 August 2017
Accepted 23 August 2017

KEYWORDS

autophagy, *Caenorhabditis elegans*, cell-to-cell heterogeneity, morphogenesis, Rho GTPases

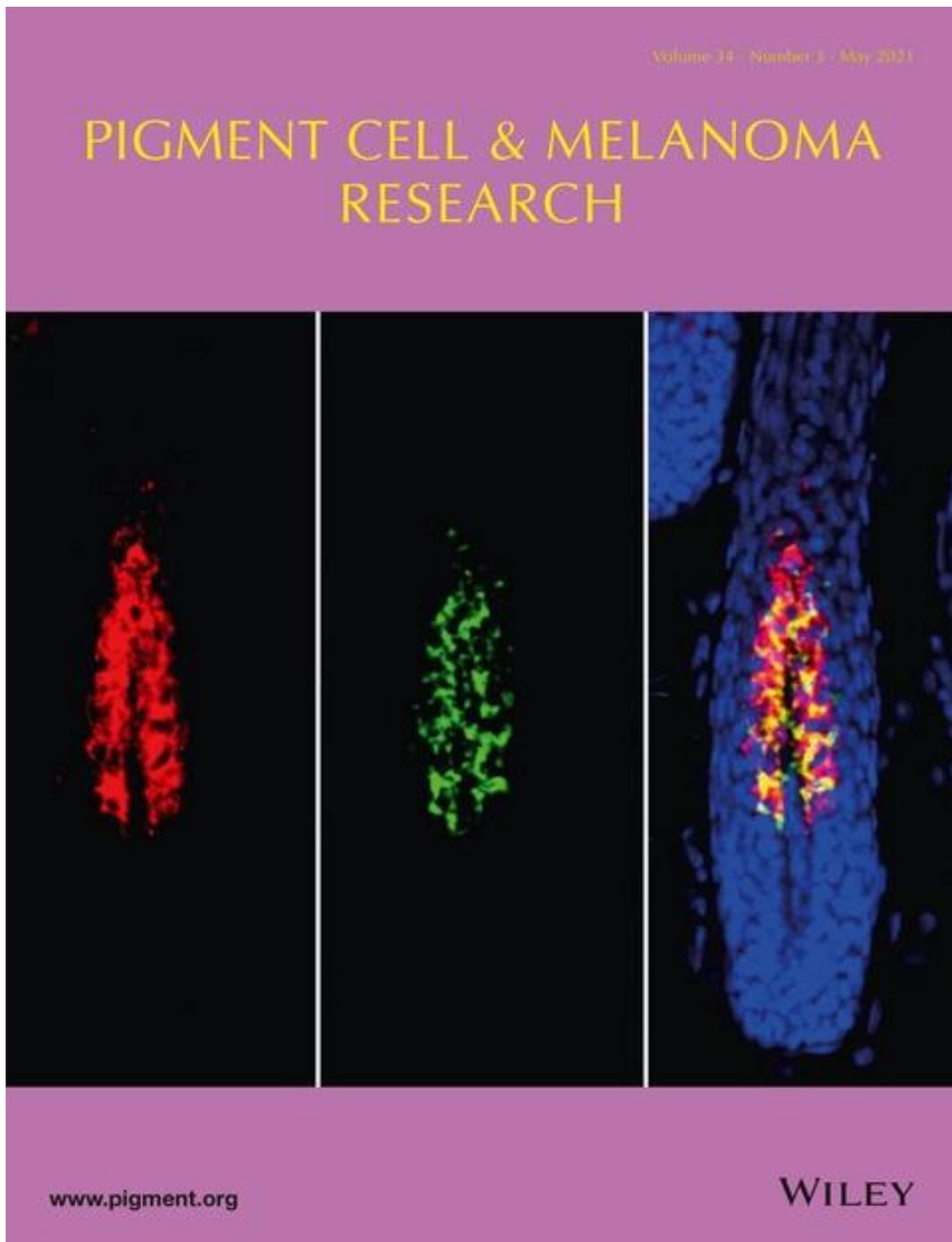
CONTACT Sarah Jenna jenna.sarah@uqam.ca Integrative Genomics and cell signaling laboratory, Chemistry-Biochemistry Department, Université du Québec à Montréal, Montreal, Canada
Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

[†] These authors have contributed equally to this work.

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

APPENDICE B

COUVERTURE DE PIGMENTED CELL & MELANOMA RESEARCH
VOLUME 34, ISSUE 3



APPENDICE C

GENETIC BACKGROUND INFLUENCES SEVERITY OF CÔLONIC AGANGLIONOSIS AND RESPONSE TO GDNF ENEMAS IN THE HOLSTEIN MOUSE MODEL OF HIRSCHSPRUNG DISEASE



x



Article

Genetic background influences severity of colonic aganglionosis and response to GDNF enemas in the *Holstein* mouse model of Hirschsprung disease

Rodolphe Soret^{1,2}, Neija Lassoued^{1,2}, Grégoire Bonnamour^{1,2}, Guillaume Bernas^{1,2}, Aurélie Barbe^{1,2}, Mélanie Pelletier^{1,2}, Manon Aichi^{1,2}, Nicolas Pilon^{1,2,3,*}

¹Molecular Genetics of Development Laboratory, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal H3C 3P8, Québec, Canada. [†]

²Centre d'excellence en recherche sur les maladies orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal H2X 3Y7, Québec, Canada. [¶]

³Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal H3T 1C5, Québec, Canada. [¶]

*Correspondence: pilon.nicolas@uqam.ca [¶]

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Abstract: Hirschsprung disease is a congenital malformation where ganglia of the neural crest-derived enteric nervous system are missing over varying lengths of the distal gastrointestinal tract. This complex genetic condition involves both rare and common variants in dozens of genes, many of which having been functionally validated in animal models. Modifier loci present in the genetic background are also believed to influence disease penetrance and severity, but this has not been frequently tested in animal models. Here, we addressed this question using *Holstein* mice in which aganglionosis is due to excessive deposition of collagen VI around the developing enteric nervous system, thereby allowing to model trisomy 21-associated Hirschsprung disease. We also asked whether the genetic background might influence the response of *Holstein* mice to GDNF enemas, which we recently showed to have regenerative properties for the missing enteric nervous system. Compared to *Holstein* mice in their original FVB/N genetic background, *Holstein* mice maintained in a C57BL/6N background were found to have a less severe enteric nervous system defect and to be more responsive to GDNF enemas. This change of genetic background had a positive impact for the enteric nervous system only, leaving the neural crest-related pigmentation phenotype of *Holstein* mice unaffected. Taken together with other similar studies, these results are thus consistent with the notion that the enteric nervous system is more sensitive to genetic background changes than other neural crest derivatives.

Keywords: Enteric nervous system; GDNF; Genetic background; Hirschsprung disease; Melanocytes; Mouse model; Neural crest; Pigmentation; Regenerative medicine; Tissue-resident stem cells.

¶

APPENDICE 4

PARTICIPATION A DES CONGRES SCIENTIFIQUES

PRESENTATIONS ORALES

Bonnamour G, Soret R, Charrier B, Pilon, N. NR2F1 régule la transition entre précurseurs des cellules de Schwann et mélanocytes dans un modèle de souris du syndrome de Waardenburg de type IV. Colloque du CERMO-FC édition 2021 (22 novembre 2021). Montréal (Qc), Canada.

Bonnamour G, Pilon N. Characterization of Waardenburg type 4 Spot mouse model reveals two distinct populations of c-kit positive cells in the follicle. 22nd European Society for Pigment Cell Research (ESPCR) Annual Meeting (12-14 sept 2019). Bruxelles, Belgique.

Bonnamour G, Martin E, Jenna S, Mitochondrial respiration controls morphogenic programs driving early elongation in *Caenorhabditis elegans*. McGill Worm meeting (5 oct 2016). Montréal (Qc), Canada.

PRESENTATION PAR POSTER

Ravaut G, Bonnamour G, Bergeron K, Pilon N, Mounier C. La diète cétogène permet d'augmenter le nombre de cellules de Schwann précurseurs au sein du nerf sciatique des souris Twitcher, modèle animal pour la maladie de Krabbe. Colloque du CERMO-FC édition 2021 (22 novembre 2021). Montréal (Qc), Canada.

Bonnamour G, Pilon N. Characterization of melanocyte development defects in Waardenburg syndrome. Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Rares (17 Mai 2019). Montréal (Qc), Canada.

Bonnamour G, Pilon N. Défauts de colonisation des mélanocytes de la peau dans le syndrome de Waardenburg-Shah. EFFERVESCENCE (24-25 Avril 2019). Montréal (Qc), Canada.

Bonnamour G, Pilon N. Characterization of melanocyte development defects in Waardenburg syndrome. Congrès Biomed/Pharmaqam (10-11 Mai 2018). Mont Gabriel (Qc), Canada.

Bonnamour G, Pilon N. Characterization of melanocyte development defects in Waardenburg syndrome. 9th Canadian Developmental Biology Conference – 7th Canada Regional SDB Conference (19-22 Mars 2018). Mont Tremblant (Qc), Canada. National.

Bonnamour G, Martin E, Mokrani A, Jenna S. The energetic perspective of cell-to-cell heterogeneity during epidermal morphogenesis in *C. elegans*. 21st international *C.elegans* Conference (21-25 Juin 2017). Los Angeles (Cal), Etats-Unis.

PRIX ET DISTINCTIONS

- 2ème meilleure présentation orale. Colloque du CERMO-FC édition 2021 (22 novembre 2021). Montréal (Qc), Canada.

- Meilleure affiche. 9th Canadian Developmental Biology Conference – 7th Canada Regional SDB Conference (19-22 Mars 2018). Mont Tremblant (Qc), Canada. National.

- Bourse d'excellence. Bourse d'excellence 2018 – 4500CAD, Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines - Fondation Courtois (CERMO-FC), Montréal (Qc), Canada.

- Bourse de voyage de l'Université du Québec à Montréal 2017 – 211,48CAD, Université du Québec à Montréal, Montréal (Qc), Canada

BIBLIOGRAPHIE

- Abe Y et Tanaka N (2017) Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Epidermal and Hair Follicle Development, Homeostasis, and Cancer. *J Dev Biol* 5:
- Ackerman SD et Monk KR (2016) The scales and tales of myelination: using zebrafish and mouse to study myelinating glia. *Brain Res* 1641: 79-91.
- Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Muller T, Fritz N, Beljajeva A, Mochii M, Liste I, et al. (2009) Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139: 366-379.
- Adameyko I, Lallemand F, Furlan A, Zinin N, Aranda S, Kitambi SS, Blanchart A, Favaro R, Nicolis S, Lubke M, et al. (2012) Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development* 139: 397-410.
- Ahlstrom JD et Erickson CA (2009) The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: a 'tail' of multiple non-obligatory cellular mechanisms. *Development* 136: 1801-1812.
- Alexeev V et Yoon K (2006) Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* 126: 1102-1110.
- Allen JR, Skeath JB et Johnson SL (2019) Maintenance of Melanocyte Stem Cell Quiescence by GABA-A Signaling in Larval Zebrafish. *Genetics* 213: 555-566.
- Anderson RB, Newgreen DF et Young HM (2006) Neural crest and the development of the enteric nervous system. *Adv Exp Med Biol* 589: 181-196.
- Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB et Ichihashi M (2012) Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes

through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J Invest Dermatol* 132: 1222-1229.

Aoki H et Moro O (2002) Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life Sci* 71: 2171-2179.

Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, Niswander L et Conlon RA (2006) Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol* 296: 164-176.

Balani K, Brito FC, Kos L et Agarwal A (2009) Melanocyte pigmentation stiffens murine cardiac tricuspid valve leaflet. *J R Soc Interface* 6: 1097-1102.

Barlow-Anacker AJ, Fu M, Erickson CS, Bertocchini F et Gosain A (2017) Neural Crest Cells Contribute an Astrocyte-like Glial Population to the Spleen. *Sci Rep* 7: 45645.

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

Bartels S, Ito S, Trune DR et Nuttall AL (2001) Noise-induced hearing loss: the effect of melanin in the stria vascularis. *Hear Res* 154: 116-123.

Baxter LL et Pavan WJ (2003) Pmel17 expression is Mitf-dependent and reveals cranial melanoblast migration during murine development. *Gene Expr Patterns* 3: 703-707.

Beauchamp RL, Erdin S, Witt L, Jordan JT, Plotkin SR, Gusella JF et Ramesh V (2021) mTOR kinase inhibition disrupts neuregulin 1-ERBB3 autocrine signaling and sensitizes NF2-deficient meningioma cellular models to IGF1R inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 296: 100157.

Bergeron KF, Cardinal T, Touré AM, Béland M, Raiwet DL, Silversides DW et Pilon N (2015) Male-biased aganglionic megacolon in the TashT mouse line due to perturbation of silencer elements in a large gene desert of chromosome 10. *PLoS Genet* 11: e1005093.

- Bergeron KF, Nguyen CM, Cardinal T, Charrier B, Silversides DW et Pilon N (2016) Upregulation of the Nr2f1-A830082K12Rik gene pair in murine neural crest cells results in a complex phenotype reminiscent of Waardenburg syndrome type 4. *Dis Model Mech* 9: 1283-1293.
- Bertacchi M, Gruart A, Kaimakis P, Allet C, Serra L, Giacobini P, Delgado-García JM, Bovolenta P et Studer M (2019a) Mouse Nr2f1 haploinsufficiency unveils new pathological mechanisms of a human optic atrophy syndrome. *EMBO Mol Med* 11: e10291.
- Bertacchi M, Parisot J et Studer M (2019b) The pleiotropic transcriptional regulator COUP-TFI plays multiple roles in neural development and disease. *Brain Research* 1705: 75-94.
- Bitgood MJ et McMahon AP (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172: 126-138.
- Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Caignec CL, Wegner M et Goossens M (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Human Molecular Genetics* 9: 1907-1917.
- Bonnamour G, Soret R et Pilon N (2021) Dhh-expressing Schwann cell precursors contribute to skin and cochlear melanocytes, but not to vestibular melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 34: 648-654.
- Borghesi A, Tironi A, Michelini S, Scrimieri A, Benetti D et Maroldi R (2019) Two synchronous lung metastases from malignant melanoma: the same patient but different morphological patterns. *Eur J Radiol Open* 6: 287-290.
- Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA et Gilchrest BA (2001) SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J* 15: 645-658.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C et Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15: 66-78.

- Bronkhorst IH et Jager MJ (2013) Inflammation in uveal melanoma. *Eye (Lond)* 27: 217-223.
- Brumbaugh JA (1968) Ultrastructural differences between forming eumelanin and pheomelanin as revealed by the pink-eye mutation in the fowl. *Dev Biol* 18: 375-390.
- Bruneel E et Gomes Silva TO (2017) Paroles de femmes noires. Circulations médiatiques et enjeux politiques. *Réseaux 201*: 59-85.
- Buchstaller J, Sommer L, Bodmer M, Hoffmann R, Suter U et Mantei N (2004) Efficient Isolation and Gene Expression Profiling of Small Numbers of Neural Crest Stem Cells and Developing Schwann Cells. *The Journal of Neuroscience* 24: 2357-2365.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D et Relaix F (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202: 59-68.
- Ceriani F et Mammano F (2012) Calcium signaling in the cochlea - Molecular mechanisms and physiopathological implications. *Cell Commun Signal* 10: 20.
- Chang TS (2009) An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10: 2440-2475.
- Charrier B et Pilon N (2017) Toward a better understanding of enteric gliogenesis. *Neurogenesis (Austin)* 4: e1293958.
- Cichorek M, Wachulska M et Stasiewicz A (2013) Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. *Open Life Sciences* 8:
- Colombo S, Champeval D, Rambow F et Larue L (2012) Transcriptomic analysis of mouse embryonic skin cells reveals previously unreported genes expressed in melanoblasts. *J Invest Dermatol* 132: 170-178.
- Colombo S, Petit V, Wagner RY, Champeval D, Yajima I, Gesbert F, Davidson I, Delmas V et Larue L (2020) Stabilization of β -catenin promotes melanocyte specification at the expense of the Schwann cell lineage. *bioRxiv* 2020.2006.2029.179291.

- Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M et Helms JA (2011) Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A* 155A: 270-279.
- Costache M, Patrascu OM, Adrian D, Costache D, Sajin M, Ungureanu E et Simionescu O (2013) Ciliary body melanoma - a particularly rare type of ocular tumor. Case report and general considerations. *Maedica (Bucur)* 8: 360-364.
- Cotsarelis G (2006) Gene expression profiling gets to the root of human hair follicle stem cells. *J Clin Invest* 116: 19-22.
- Coutaud B et Pilon N (2013) Characterization of a novel transgenic mouse line expressing Cre recombinase under the control of the Cdx2 neural specific enhancer. *Genesis* 51: 777-784.
- Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, et al. (2007) Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128: 853-864.
- Davie SA, Maglione JE, Manner CK, Young D, Cardiff RD, MacLeod CL et Ellies LG (2007) Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic Res* 16: 193-201.
- Dika E, Fanti PA, Vaccari S, Patrizi A et Maibach HI (2010) Causal relationship between exposure to chemicals and malignant melanoma? A review and study proposal. *Rev Environ Health* 25: 255-259.
- Doerflinger NH, Macklin WB et Popko B (2003) Inducible site-specific recombination in myelinating cells. *Genesis* 35: 63-72.
- Dolinska MB, Kovaleva E, Backlund P, Wingfield PT, Brooks BP et Sergeev YV (2014) Albinism-causing mutations in recombinant human tyrosinase alter intrinsic enzymatic activity. *PLoS One* 9: e84494.
- Dorothy Wolff MA (1931) MELANIN IN THE INNER EAR. *Arch Otolaryngol* 1931;14(2):195-211:
- Dorsky RI, Moon RT et Raible DW (1998) Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396: 370-373.

- Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, Ferron SR, Herault Y, Pavlovic G, Ferguson-Smith AC, et al. (2013) Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 504: 277-281.
- Du J et Fisher DE (2002) Identification of Aim-1 as the underwhite mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. *J Biol Chem* 277: 402-406.
- Dupin E, Baroffio A, Dulac C, Cameron-Curry P et Le Douarin NM (1990) Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-Schwann cell myelin protein monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1119-1123.
- Dupin E, Calloni GW, Coelho-Aguiar JM et Le Douarin NM (2018) The issue of the multipotency of the neural crest cells. *Dev Biol* 444 Suppl 1: S47-S59.
- Dupin E, Glavieux C, Vaigot P et Le Douarin NM (2000) Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7882-7887.
- Dushane GP (1938) Neural fold derivatives in the amphibia: Pigment cells, spinal ganglia and Rohon-Beard cells. *Journal of Experimental Zoology* 78: 485-503.
- Dwyer T, Muller HK, Blizzard L, Ashbolt R et Phillips G (1998) The use of spectrophotometry to estimate melanin density in Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 203-206.
- Edery P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A et Lyonnet S (1996) Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12: 442-444.
- Espinosa-Medina I, Outin E, Picard CA, Chettouh Z, Dymecki S, Consalez GG, Coppola E et Brunet JF (2014) Neurodevelopment. Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors. *Science* 345: 87-90.
- Evans DJ (2003) Contribution of somitic cells to the avian ribs. *Dev Biol* 256: 114-126.

- Falabella R (2009) Vitiligo and the melanocyte reservoir. *Indian J Dermatol* 54: 313-318.
- Fanon F (1952) *Peau noire, masques blancs*.
- Fitzpatrick TB et Lerner AB (1954) Biochemical basis of human melanin pigmentation. *AMA Arch Derm Syphilol* 69: 133-149.
- Frunchak YN et Milos NC (1990) Studies on cellular adhesion of *Xenopus laevis* melanophores: pigment pattern formation and alteration in vivo by endogenous galactoside-binding lectin or its sugar hapten inhibitor. *Pigment Cell Res* 3: 101-114.
- Furlan A et Adameyko I (2018) Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? *Dev Biol* 444 Suppl 1: S25-S35.
- Gaggioli C, Busca R, Abbe P, Ortonne JP et Ballotti R (2003) Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res* 16: 374-382.
- Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P et Birchmeier C (2000) A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* 148: 1035-1046.
- Goding CR (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14: 1712-1728.
- Gola M, Czajkowski R, Bajek A, Dura A et Drewa T (2012) Melanocyte stem cells: biology and current aspects. *Med Sci Monit* 18: RA155-159.
- Grimes PE et Miller MM (2018) Vitiligo: Patient stories, self-esteem, and the psychological burden of disease. *Int J Womens Dermatol* 4: 32-37.
- Gudjohnsen SA, Atacho DA, Gesbert F, Raposo G, Hurbain I, Larue L, Steingrimsson E et Petersen PH (2015) Meningeal Melanocytes in the Mouse: Distribution and Dependence on Mitf. *Front Neuroanat* 9: 149.

Gupta AK, Bharadwaj M et Mehrotra R (2016) Skin Cancer Concerns in People of Color: Risk Factors and Prevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 17: 5257-5264.

Guyonneau L, Murisier F, Rossier A, Moulin A et Beermann F (2004) Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol* 24: 3396-3403.

Hari L, Miescher I, Shakhova O, Suter U, Chin L, Taketo M, Richardson WD, Kessar N et Sommer L (2012) Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/beta-catenin signaling. *Development* 139: 2107-2117.

Harris ML, Baxter LL, Loftus SK et Pavan WJ (2010) Sox proteins in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 496-513.

Helzner EP, Cauley JA, Pratt SR, Wisniewski SR, Zmuda JM, Talbott EO, de Rekeneire N, Harris TB, Rubin SM, Simonsick EM, et al. (2005) Race and sex differences in age-related hearing loss: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 53: 2119-2127.

Hilding DA et Ginzberg RD (1977) Pigmentation of the stria vascularis. The contribution of neural crest melanocytes. *Acta Otolaryngol* 84: 24-37.

Ho MK, Li X, Wang J, Ohmen JD et Friedman RA (2014) FVB/NJ mice demonstrate a youthful sensitivity to noise-induced hearing loss and provide a useful genetic model for the study of neural hearing loss. *Audiol Neurotol Extra* 4: 1-11.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A et Yanagisawa M (1994) Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79: 1267-1276.

Hu DN, Savage HE et Roberts JE (2002) Uveal melanocytes, ocular pigment epithelium, and Muller cells in culture: in vitro toxicology. *Int J Toxicol* 21: 465-472.

Hwang H, Liu F, Petrenko NB, Huang J, Schillinger KJ et Patel VV (2015) Cardiac melanocytes influence atrial reactive oxygen species involved with electrical and structural remodeling in mice. *Physiol Rep* 3:

- Issa S, Bondurand N, Faubert E, Poisson S, Lecerf L, Nitschke P, Deggouj N, Loundon N, Jonard L, David A, et al. (2017) EDNRB mutations cause Waardenburg syndrome type II in the heterozygous state. *Hum Mutat* 38: 581-593.
- Ivashkin E et Adameyko I (2013) Progenitors of the protochordate ocellus as an evolutionary origin of the neural crest. *Evodevo* 4: 12.
- J. Gordon Betts KAY, James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix (2013) *Anatomy and Physiology* OpenStax,
- Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoeath S, Grosveld F et Meijer D (2003) The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev* 17: 1380-1391.
- Jeong SM et Yoon TJ (2021) Development of Pigmentation-Regulating Agents by Drug Repositioning. *Int J Mol Sci* 22:
- Jessen KR et Mirsky R (2002) Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200: 367-376.
- Jessen KR et Mirsky R (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6: 671-682.
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP et Sucov HM (2000) Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127: 1607-1616.
- Juráňová J, Franková J et Ulrichová J (2017) The role of keratinocytes in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine* 15: 169-179.
- Kahane N et Kalcheim C (2020) Neural tube development depends on notochord-derived sonic hedgehog released into the sclerotome. *Development* 147:
- Kaidbey KH, Agin PP, Sayre RM et Kligman AM (1979) Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *J Am Acad Dermatol* 1: 249-260.
- Kasemeier-Kulesa JC, Kulesa PM et Lefcort F (2005) Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Development* 132: 235-245.

- Kaucka M, Szarowska B, Kavkova M, Kastriti ME, Kameneva P, Schmidt I, Peskova L, Joven Araus A, Simon A, Kaiser J, et al. (2021) Nerve-associated Schwann cell precursors contribute extracutaneous melanocytes to the heart, inner ear, supraorbital locations and brain meninges. *Cell Mol Life Sci* 78: 6033-6049.
- Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, Dyachuk V, Kaucka M, Furlan A, An Z, Wang L, Hultman I, Ahrlund-Richter L, et al. (2014) Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 513: 551-554.
- Kim H-S, Lee J, Lee DY, Kim Y-D, Kim JY, Lim HJ, Lim S et Cho YS (2017) Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair. *Stem Cell Reports* 8: 1714-1726.
- Klein D (1983) Historical background and evidence for dominant inheritance of the Klein-Waardenburg syndrome (type III). *Am J Med Genet* 14: 231-239.
- LaFerriere KA, Arenberg IK, Hawkins JE et Johnsson L-G (1974) Melanocytes of the Vestibular Labyrinth and Their Relationship to the Microvasculature. *Annals of Otolaryngology & Laryngology* 83: 685-694.
- Lahav R, Dupin E, Lecoin L, Glavieux C, Champeval D, Ziller C et Le Douarin NM (1998) Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14214-14219.
- Lahav R, Heffner G et Patterson PH (1999) An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11496-11500.
- Lahav R, Ziller C, Dupin E et Le Douarin NM (1996) Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3892-3897.
- Lakin ND et Jackson SP (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18: 7644-7655.

- Le Douarin NM (1975) The neural crest in the neck and other parts of the body. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11: 19-50.
- Lee HO, Levorse JM et Shin MK (2003) The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Dev Biol* 259: 162-175.
- Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, Macklin WB, Chambon P et Suter U (2003) Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 22: 430-440.
- Levin MD, Lu MM, Petrenko NB, Hawkins BJ, Gupta TH, Lang D, Buckley PT, Jochems J, Liu F, Spurney CF, et al. (2009) Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers. *J Clin Invest* 119: 3420-3436.
- Levy C, Khaled M et Fisher DE (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12: 406-414.
- Liao CP, Booker RC, Morrison SJ et Le LQ (2017) Identification of hair shaft progenitors that create a niche for hair pigmentation. *Genes Dev* 31: 744-756.
- Lin BM, Li WQ, Curhan SG, Stankovic KM, Qureshi AA et Curhan GC (2017) Skin Pigmentation and Risk of Hearing Loss in Women. *Am J Epidemiol* 186: 1-10.
- Liu S, Zhang H et Duan E (2013) Epidermal development in mammals: key regulators, signals from beneath, and stem cells. *Int J Mol Sci* 14: 10869-10895.
- Liu Y, Yang N et Teng CT (1993) COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol Cell Biol* 13: 1836-1846.
- Liu Z, Jin YQ, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, Wu W, Qi Z et Shen Z (2015) Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One* 10: e0123278.

- Lopez-Anido C, Sun G, Koenning M, Srinivasan R, Hung HA, Emery B, Keles S et Svaren J (2016) Differential Sox10 Genomic Occupancy in Myelinating Glia. *Glia*
- Luciani F, Champeval D, Herbette A, Denat L, Aylaj B, Martinozzi S, Ballotti R, Kemler R, Goding CR, De Vuyst F, et al. (2011) Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 138: 3943-3954.
- Lyons DA, Pogoda HM, Voas MG, Woods IG, Diamond B, Nix R, Arana N, Jacobs J et Talbot WS (2005) *erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr Biol* 15: 513-524.
- Macklin WB et Rasband MN (2012) Chapter 31 - Formation and Maintenance of Myelin. Dans *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Brady ST, Siegel GJ, Albers RW et Price DL, eds. Academic Press. New York.
- Mahmoudi A, Rami M, Khattala K, Elmadi A, Afifi MA et Youssef B (2013) Shah-Waardenburg syndrome. *Pan Afr Med J* 14: 60.
- Marks MS et Seabra MC (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 738-748.
- Métivier R, Le Dréan Y, Salbert G et Pakdel F (2000) Interplay between liganded and orphan nuclear receptors controls reproductive pathways. *Biochem Cell Biol* 78: 345-358.
- Milet C et Monsoro-Burq AH (2012) Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol* 366: 22-33.
- Miniati A, Weng Z, Zhang B, Therianou A, Vasiadi M, Nicolaidou E, Stratigos AJ, Antoniou C et Theoharides TC (2014) Stimulated human melanocytes express and release interleukin-8, which is inhibited by luteolin: relevance to early vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 39: 54-57.
- Mintz B (1967) Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 344-351.
- Montemayor C, Montemayor OA, Ridgeway A, Lin F, Wheeler DA, Pletcher SD et Pereira FA (2010) Genome-wide analysis of binding sites and direct

target genes of the orphan nuclear receptor NR2F1/COUP-TFI. *PLoS One* 5: e8910.

Mort RL, Jackson IJ et Patton EE (2015) The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142: 620-632.

Mull AN, Zolekar A et Wang YC (2015) Understanding Melanocyte Stem Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine Applications. *Int J Mol Sci* 16: 30458-30469.

Naka H, Nakamura S, Shimazaki T et Okano H (2008) Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. *Nat Neurosci* 11: 1014-1023.

Nakamura M, Tobin DJ, Richards-Smith B, Sundberg JP et Paus R (2002) Mutant laboratory mice with abnormalities in pigmentation: annotated tables. *J Dermatol Sci* 28: 1-33.

Nataf V, Mercier P, Ziller C et Le Douarin NM (1993) Novel markers of melanocyte differentiation in the avian embryo. *Exp Cell Res* 207: 171-182.

Nishimura EK (2011) Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 401-410.

Nishimura EK, Yoshida H, Kunisada T et Nishikawa SI (1999) Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev Biol* 215: 155-166.

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

Niu C et Aisa HA (2017) Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules* 22:

Noramly S, Freeman A et Morgan BA (1999) beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* 126: 3509-3521.

- Nowotschin S, Setty M, Kuo YY, Liu V, Garg V, Sharma R, Simon CS, Saiz N, Gardner R, Boutet SC, et al. (2019) The emergent landscape of the mouse gut endoderm at single-cell resolution. *Nature* 569: 361-367.
- Olivera-Martinez I, Coltey M, Dhouailly D et Pourquie O (2000) Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. *Development* 127: 4611-4617.
- Olivera-Martinez I, Thelu J, Teillet MA et Dhouailly D (2001) Dorsal dermis development depends on a signal from the dorsal neural tube, which can be substituted by Wnt-1. *Mech Dev* 100: 233-244.
- Oren M et Bartek J (2007) The Sunny Side of p53. *Cell* 128: 826-828.
- Osawa M, Egawa G, Mak SS, Moriyama M, Freter R, Yonetani S, Beermann F et Nishikawa S (2005) Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development* 132: 5589-5599.
- Osorio L, Teillet MA, Palmeirim I et Catala M (2009) Neural crest ontogeny during secondary neurulation: a gene expression pattern study in the chick embryo. *Int J Dev Biol* 53: 641-648.
- Ozburn AR, Harris RA et Blednov YA (2010) Behavioral differences between C57BL/6J x FVB/NJ and C57BL/6J x NZB/B1NJ F1 hybrid mice: relation to control of ethanol intake. *Behav Genet* 40: 551-563.
- Parfejevs V, Debbache J, Shakhova O, Schaefer SM, Glausch M, Wegner M, Suter U, Riekstina U, Werner S et Sommer L (2018) Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. *Nat Commun* 9: 236.
- Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR et Mirsky R (1999a) Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23: 713-724.
- Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR et Mirsky R (1999b) Schwann Cell-Derived Desert Hedgehog Controls the Development of Peripheral Nerve Sheaths. *Neuron* 23: 713-724.

- Pastore S, Mascia F, Mariani V et Girolomoni G (2006) Keratinocytes in skin inflammation. *Expert Review of Dermatology 1*: 279-291.
- Pattison DI et Davies MJ (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS 131-157*.
- Patuzzi R (2011) Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential. *Hear Res 277*: 4-19.
- Peters EM, Tobin DJ, Botchkareva N, Maurer M et Paus R (2002) Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. *J Histochem Cytochem 50*: 751-766.
- Petit A (2012) La dépigmentation volontaire : tours et détours de la honte. *Champ psy 62*: 153-164.
- Picardo M, Dell'Anna ML, Ezzedine K, Hamzavi I, Harris JE, Parsad D et Taieb A (2015) Vitiligo. *Nat Rev Dis Primers 1*: 15011.
- Pillaiyar T, Manickam M et Namasivayam V (2017) Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem 32*: 403-425.
- Pilon N (2016) Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Dis 4*: e1156287.
- Pilon N (2021) Treatment and Prevention of Neurocristopathies. *Trends Mol Med 27*: 451-468.
- Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, Goossens M, Marlin S et Bondurand N (2010) Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat 31*: 391-406.
- Prummel KD, Nieuwenhuize S et Mosimann C (2020) The lateral plate mesoderm. *Development 147*:
- Ramakrishna P et Rajni T (2014) Psychiatric morbidity and quality of life in vitiligo patients. *Indian J Psychol Med 36*: 302-303.

- Raue S, Wedekind D, Wiltfang J et Schmidt U (2019) The Role of Proopiomelanocortin and alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone in the Metabolic Syndrome in Psychiatric Disorders: A Narrative Mini-Review. *Front Psychiatry* 10: 834.
- Rawles ME (1947) Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiol Zool* 20: 248-266.
- Read J, Wadt KAW et Hayward NK (2016) Melanoma genetics. *Journal of Medical Genetics* 53: 1-14.
- Riding RL, Richmond JM et Harris JE (2019) Mouse Model for Human Vitiligo. *Curr Protoc Immunol* 124: e63.
- Ritchie HH, Wang LH, Tsai S, O'Malley BW et Tsai MJ (1990) COUP-TF gene: a structure unique for the steroid/thyroid receptor superfamily. *Nucleic Acids Res* 18: 6857-6862.
- Ritter KE et Martin DM (2019) Neural crest contributions to the ear: Implications for congenital hearing disorders. *Hear Res* 376: 22-32.
- Rohr O, Aunis D et Schaeffer E (1997) COUP-TF and Sp1 interact and cooperate in the transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human microglial cells. *J Biol Chem* 272: 31149-31155.
- Ruhrberg C et Schwarz Q (2010) In the beginning: Generating neural crest cell diversity. *Cell Adh Migr* 4: 622-630.
- Saldana-Caboverde A et Kos L (2010) Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 160-170.
- Sample A et He YY (2018) Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 34: 13-24.
- Sandell LL, Butler Tjaden NE, Barlow AJ et Trainor PA (2014) Cochleovestibular nerve development is integrated with migratory neural crest cells. *Dev Biol* 385: 200-210.

- Schilling TF et Le Pabic P (2014) Neural Crest Cells in Craniofacial Skeletal Development. Dans *Neural Crest Cells*.
- Schmidt-Ullrich R et Paus R (2005) Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays* 27: 247-261.
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R et Paus R (2009) The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol* 19: R132-142.
- Schrott A et Spoenclin H (1987) Pigment anomaly-associated inner ear deafness. *Acta Otolaryngol* 103: 451-457.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F et Pachnis V (1995) RET-deficient mice: an animal model for Hirschsprung's disease and renal agenesis. *J Intern Med* 238: 327-332.
- Seiji M et Fitzpatrick TB (1961) The reciprocal relationship between melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). *J Biochem* 49: 700-706.
- Seiji M, Fitzpatrick TB et Birbeck MS (1961) The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol* 36: 243-252.
- Serbedzija GN, Fraser SE et Bronner-Fraser M (1990) Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development* 108: 605-612.
- Sergi C (2015) Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100(th) anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. *World J Clin Pediatr* 4: 120-125.
- Shah KN, Dalal SJ, Desai MP, Sheth PN, Joshi NC et Ambani LM (1981) White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. *J Pediatr* 99: 432-435.
- Sharghi-Namini S, Turmaine M, Meier C, Sahni V, Umehara F, Jessen KR et Mirsky R (2006) The structural and functional integrity of peripheral

nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J Neurosci* 26: 6364-6376.

- Shen L, Pichel JG, Mayeli T, Sariola H, Lu B et Westphal H (2002) Gdnf haploinsufficiency causes Hirschsprung-like intestinal obstruction and early-onset lethality in mice. *Am J Hum Genet* 70: 435-447.
- Simoës-Costa M et Bronner ME (2015) Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142: 242-257.
- Sinnberg T, Levesque MP, Krochmann J, Cheng PF, Ikenberg K, Meraz-Torres F, Niessner H, Garbe C et Busch C (2018) Wnt-signaling enhances neural crest migration of melanoma cells and induces an invasive phenotype. *Mol Cancer* 17: 59.
- Sitiwin E, Madigan MC, Gratton E, Cherepanoff S, Conway RM, Whan R et Macmillan A (2019) Shedding light on melanins within in situ human eye melanocytes using 2-photon microscopy profiling techniques. *Sci Rep* 9: 18585.
- Smith CA, Lowry OH et Wu ML (1954) The electrolytes of the labyrinthine fluids. *Laryngoscope* 64: 141-153.
- Smith JL et Schoenwolf GC (1997) Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* 20: 510-517.
- Smits P et Lefebvre V (2003) Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Development* 130: 1135-1148.
- Soldatov R, Kaucka M, Kastriti ME, Petersen J, Chontorotzea T, Englmaier L, Akkuratova N, Yang Y, Haring M, Dyachuk V, et al. (2019) Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science* 364:
- Sommer L (2011) Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 411-421.
- Soret R, Mennetrey M, Bergeron KF, Dariel A, Neunlist M, Grunder F, Faure C, Silversides DW, Pilon N et Ente-Hirsch Study G (2015) A collagen VI-

dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J Clin Invest* 125: 4483-4496.

Soret R, Schneider S, Bernas G, Christophers B, Souchkova O, Charrier B, Righini-Grunder F, Aspirot A, Landry M, Kembel SW, et al. (2020) Glial Cell Derived Neurotrophic Factor Induces Enteric Neurogenesis and Improves Colon Structure and Function in Mouse Models of Hirschsprung Disease. *Gastroenterology*

Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21: 70-71.

Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM et Costantini F (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1: 4.

Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, Goossens M et Bondurand N (2006) Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 295: 232-249.

Steel KP et Barkway C (1989) Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development* 107: 453-463.

Sturm RA et Frudakis TUBE NEURAL (2004) Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends Genet* 20: 327-332.

Sugumaran M et Berek H (2016) Critical Analysis of the Melanogenic Pathway in Insects and Higher Animals. *Int J Mol Sci* 17:

Sundaram VK, El Jalkh T, Barakat R, Fernandez CJI, Massaad C et Grenier J (2021) Retracing Schwann Cell Developmental Transitions in Embryonic Dissociated DRG/Schwann Cell Cocultures in Mice. *Front Cell Neurosci* 15: 590537.

Suter MM, Schulze K, Bergman W, Welle M, Roosje P et Muller EJ (2009) The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol* 20: 515-532.

Szabo A et Mayor R (2018) Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annu Rev Genet* 52: 43-63.

- Tachibana M (1999) Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res* 12: 344-354.
- Tachibana M, Kobayashi Y et Matsushima Y (2003) Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. *Pigment Cell Res* 16: 448-454.
- Takeda K, Yasumoto K, Takada R, Takada S, Watanabe K, Udono T, Saito H, Takahashi K et Shibahara S (2000) Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem* 275: 14013-14016.
- Thody AJ et Shuster S (1989) Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* 69: 383-416.
- Trainor PA (2010) Craniofacial birth defects: The role of neural crest cells in the etiology and pathogenesis of Treacher Collins syndrome and the potential for prevention. *Am J Med Genet A* 152A: 2984-2994.
- Tran P, Zhang XK, Salbert G, Hermann T, Lehmann JM et Pfahl M (1992) COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Mol Cell Biol* 12: 4666-4676.
- Tsatmali M, Ancans J et Thody AJ (2002) Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 50: 125-133.
- Tsujimura T, Morii E, Nozaki M, Hashimoto K, Moriyama Y, Takebayashi K, Kondo T, Kanakura Y et Kitamura Y (1996) Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood* 88: 1225-1233.
- Tudrej KB, Czepielewska E et Kozłowska-Wojciechowska M (2017) SOX10-MITF pathway activity in melanoma cells. *Arch Med Sci* 13: 1493-1503.
- Uesaka T, Nagashimada M et Enomoto H (2015) Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J Neurosci* 35: 9879-9888.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, et al. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347: 1260419.

- van Beelen ESA, van der Valk WH, de Groot J, Hensen EF, Locher H et van Benthem PPG (2020) Migration and fate of vestibular melanocytes during the development of the human inner ear. *Dev Neurobiol* 80: 411-432.
- Van Raamsdonk CD et Deo M (2013) Links between Schwann cells and melanocytes in development and disease. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 634-645.
- Van Raamsdonk CD, Fitch KR, Fuchs H, de Angelis MH et Barsh GS (2004) Effects of G-protein mutations on skin color. *Nat Genet* 36: 961-968.
- Victorelli S, Lagnado A, Halim J, Moore W, Talbot D, Barrett K, Chapman J, Birch J, Ogrodnik M, Meves A, et al. (2019) Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J* 38: e101982.
- Waardenburg PJ (1951) A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet* 3: 195-253.
- Wang LH, Tsai SY, Sagami I, Tsai MJ et O'Malley BW (1987) Purification and characterization of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor from HeLa cells. *J Biol Chem* 262: 16080-16086.
- Wang X, Chan AK, Sham MH, Burns AJ et Chan WY (2011) Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology* 141: 992-1002 e1001-1006.
- Wang X et Wu Y (2014) Molecular Signals Underlying Hair Follicle Morphogenesis and Cutaneous Regeneration. Dans *Tumor Dormancy, Quiescence, and Senescence, Volume 2: Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies*. Hayat MA, ed. Springer Netherlands. Dordrecht.
- Ward WH FJ (2017) *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* Codon Publications
- Copyright © 2017 Codon Publications., Brisbane (AU).
- Webb AA (2009) Brainstem auditory evoked response (BAER) testing in animals. *Can Vet J* 50: 313-318.

- Wehrle-Haller B et Weston JA (1995) Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 121: 731-742.
- Westerhof W (2006) The discovery of the human melanocyte. *Pigment Cell Res* 19: 183-193.
- White RM et Zon LI (2008) Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell* 3: 242-252.
- Wlizla M et Zorn AM (2015) Chapter 13 - Vertebrate Endoderm Formation. Dans *Principles of Developmental Genetics (Second Edition)*. Moody SA, ed. Academic Press. Oxford.
- Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, Zimmermann DR, Dufour S, Thiery JP, Meijer D, et al. (2006) Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 175: 1005-1015.
- Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, Wen W et Gong X (2020) Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMedical Engineering OnLine* 19: 9.
- Xie B, Chen M, Ding P, Lei L, Zhang X, Zhu D, Zou Y, Deng Z, Sun G, Li J, et al. (2020) Induction of dermal fibroblasts into dermal papilla cell-like cells in hydrogel microcapsules for enhanced hair follicle regeneration. *Applied Materials Today* 21:
- Xie M, Kamenev D, Kaucka M, Kastriti ME, Zhou B, Artemov AV, Storer M, Fried K, Adameyko I, Dyachuk V, et al. (2019) Schwann cell precursors contribute to skeletal formation during embryonic development in mice and zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Yajima I et Larue L (2008) The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 471-476.
- Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Yamamoto N, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K et Akamatsu H (2013) Wnt/ β -catenin and kit signaling sequentially regulate melanocyte stem cell differentiation in UVB-induced epidermal pigmentation. *J Invest Dermatol* 133: 2753-2762.

- Yamaguchi H, Zhou C, Lin SC, Durand B, Tsai SY et Tsai MJ (2004) The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes. *Dev Biol* 266: 238-251.
- Yang FC, Zhang Y et Rheinstadter MC (2014) The structure of people's hair. *PeerJ* 2: e619.
- Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y et Shibahara S (1994) Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14: 8058-8070.
- Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y et Shibahara S (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem* 272: 503-509.
- Yoder RM et Taube JS (2009) Head direction cell activity in mice: robust directional signal depends on intact otolith organs. *J Neurosci* 29: 1061-1076.
- Yoon JH, Kim HJ, Kim JH, Kim TH, Seo CH, Sung YK et Kim KH (2020) BMP4-Induced Differentiation of Human Hair Follicle Neural Crest Stem Cells into Precursor Melanocytes from Hair Follicle Bulge. *Ann Dermatol* 32: 409-416.
- Zdebik AA, Wangemann P et Jentsch TJ (2009) Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda)* 24: 307-316.
- Zeng Q, Macri LK, Prasad A, Clark RAF, Zeugolis DI, Hanley C, Garcia Y, Pandit A, Leavesley DI, Stupar D, et al. (2017) 6.20 Skin Tissue Engineering ☆. Dans *Comprehensive Biomaterials II*.
- Zhang S, Xu H, Tian Y, Liu D, Hou X, Zeng B, Chen B, Liu H, Li R, Li X, et al. (2021) High Genetic Heterogeneity in Chinese Patients With Waardenburg Syndrome Revealed by Next-Generation Sequencing. *Front Genet* 12: 643546.
- Zhang Y, Cai Y, Shi M, Jiang S, Cui S, Wu Y, Gao XH et Chen HD (2016) The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. *PLoS One* 11: e0163806.

Zhou T, Liu W, Yu X, Cao Z, Mu W, Hou P, Ren C et Li A (2021) Aberrant Development of Enteric Glial Cells in the C \acute{o} lon of Hirschsprung's Disease. *Front Pediatr* 9: 746274.

Zhu Y-a, Giles S, Young G, Hu Y, Bazzi M, Ahlberg PE, Zhu M et Lu J (2020) Endocast and bony labyrinth of a stem gnathostome shed light on the earliest diversification of jawed vertebrates. *bioRxiv* 2020.2008.2011.242974.

Zocco M et Blanpain C (2017) Identifying the niche controlling melanocyte differentiation. *Genes Dev* 31: 721-723.

Zokaei S, Farhud DD, Keykhaei M, Zarif Yeganeh M, Rahimi H et Moravvej H (2019) Cultured Epidermal Melanocyte Transplantation in Vitiligo: A Review Article. *Iran J Public Health* 48: 388-399.