

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Sciences, Technologie, Santé ED 258

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1061 INRA, Génétique Moléculaire Animale

N° 11-2004

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Sylvain GUIBERT

Le 2 Juillet 2004

Génétique de la coloration de la robe chez les bovins : contribution à l'étude du rôle des gènes de la famille tyrosinase.

Directeur de Thèse : Ahmad OULMOUDEN

Jury :

Rapporteurs :	M. Gérard GUERIN	Directeur de Recherche, INRA
	M. Carlo RENIERI	Professeur, Université de Camerino, Italie
Examineurs :	M. Philippe MULSANT	Chargé de Recherche, INRA
	M. Raymond JULIEN	Professeur, Université de Limoges
	M. Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherche, INRA
	M. Ahmad OULMOUDEN	Maître de Conférences, Université de Limoges

A mes parents et mon frère

A mes grand-mères, Yvette et Jeanne

A Carole

Remerciements

Les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'aboutissement de ma thèse se reconnaîtront. Nul n'est donc besoin de citer tout le monde dans une liste dont l'exhaustivité serait incertaine.

Je remercie néanmoins Mr Ahmad Oulmouden pour avoir encadrer mon travail, Mr Raymond Julien pour m'avoir permis de l'effectuer ainsi que tous les membres du jury pour avoir accepté de juger mont travail.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement celle sans qui ce manuscrit n'existerait certainement pas, Carole. Merci de m'avoir accompagné et soutenu dans les bons et les mauvais moments de ma vie et donc de ma thèse.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 α -MSH: α -Melanocyte Stimulating Hormone
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP : Protéine Adaptatrice
ARN : Acide RiboNucléique
BSA : Albumine Sérique Bovine
CRE : Elément de Réponse à l'AMPc
CREB : Protéine de liaison à CRE
DCT : Dopachrome Tautomérase
ddNTP : DiDésoxyriboNucléotide TriPhosphate
Dnase : Déoxyribonucléase
dNTP : DésoxyNucléotide TriPhosphate
DHI : DiHydroxyIndole
DHICA : DiHydroxyIndole Carboxylic acid
DOPA : Dihydroxyphenylalanine
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
EGF : Facteur de croissance épidermique
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GP100 : Glycoprotéine 100
GSP1, 2 : Gene Specific Primer 1 et 2
GTPase : Guanosine 5'-Triphosphatase
LAMP1, 2 : Lysosomal-Associated Membrane Glycoprotein-1, 2
LCR : Région de Contrôle de Locus
MC1R : Récepteur 1 aux Mélanocortines
MITF : Microphtalmia-associated Transcription Factor
MLPH : mélanophiline
MNK : menkes
MSEu, i : élément spécifique des mélanocytes amont et initiateur
OCA : Albinisme OculoCutané

PAR2 : Proteinase-Activated Receptor 2

PAX3 : PAired boX gene 3

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PDZ : protéines Psd-95, Dlg and ZO1

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PKA, PKC : Protéine Kinase A et C

PMSF : PhenylMethaneSulfonyl Fluoride

PNGase : Peptide N-Glucosidase

RACE-PCR : Amplification Rapide des Extrémités d'ADNc-Réaction de Polymérisation en Chaîne

RE, RER : Réticulum Endoplasmique, Réticulum Endoplasmique Rugueux

Rnase : Ribonucléase

RT-PCR : transcription inverse – Réaction de Polymérisation en Chaîne

SDS, SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide

Gel Electrophoresis

SNARE : SNAP REceptor

SOD : SuperOxide Dismutase

SOX10 : SRY-box containing gene 10

TBX2 : T BoX transcription factor 2

TDE : Tyrosinase Distal Element

TEMED : TEtraMEthylethyleneDiamine

TGN : réseau trans-Golgi

TSR : Template Suppression Reagent

TYR : tyrosinase humaine ou bovine

Tyr : tyrosinase murine

TYRP1 : tyrosinase related protein 1 humaine ou bovine

Tyrp1 : tyrosinase related protein 1 murine

UPRA : Unités Nationales de Sélection et de Promotion de Race

USF1 : UV-activated upstream Stimulatory Factor 1

UTR : région non traduite

Publications et communications

Publications

Guibert, S., Girardot, M., Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A. (2004). Pheomelanin Coat Colour Dilution in French Cattle Breeds is not Correlated with the *TYR*, *TYRP1* and *DCT* Transcription Levels. *Pigment Cell Res* 17(4): 337-45.

Girardot, M., Martin, J., **Guibert, S.**, Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A. (2004). Widespread expression of the bovine *AGOUTI* gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res.* (acceptée).

Guibert*, S., Girardot*, M., Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A. (2004). The *Agouti* allele is responsible for the brindle coat color in Normande cattle. *Pigment Cell Res.* (en rédaction). * : contribution égale.

Communications orales

Guibert S. (2002) Gènes et enzymes de la mélanogénèse. Rencontre du réseau Gène de Coloration des Animaux Domestiques (GCAD), 16-17 décembre, Limoges.

Guibert S. (2004) Rôle des gènes *TYR*, *TRP1*, *TRP2* et *RAB38* dans la couleur des robes chez le bovin. 4^{ème} Séminaire des Thésards INRA, 14-15 mai, Rennes.

Guibert S. (2004) Gènes de la coloration chez le bovin : Etude des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*. Rencontre du réseau Gène de Coloration des Animaux Domestiques (GCAD), 12-13 février, Paris.

Communications écrites

Guibert, S., Girardot, M., Rouzaud, F., Martin, J., Laforêt, M.P., Menissier, F., Levéziel, H., Boichard, M., Julien, R., Oulmouden, A. (2002) Traçabilité des produits d'origine bovine au moyen de tests moléculaires portant sur les gènes contrôlant la coloration de la robe. 9^{ème} Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande, 15-16 octobre, Clermont-Ferrand.

Girardot, M., **Guibert, S.**, Laforet, M.P., Levéziel, H., Julien, R. Oulmouden, A. (2003). Exploitation des gènes de la coloration de la robe pour une traçabilité raciale des produits d'origine bovine. Réunion 3R, Paris, 3-4 Décembre. Renc. Rech. Ruminants, 10, 33-36.

Girardot, M., **Guibert, S.**, Julien, R., Levéziel, H., Oulmouden, A. (2004). Widespread expression of the bovine *AGOUTI* gene results from at least three alternative promoters. 12th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research, Paris. 22-25 Sept.

Guibert, S., Girardot, M., Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A. (2004). Pheomelanin coat colour dilution in french cattle breeds is not correlated with the *tyr*, *tyrp1* and *dct* transcription levels. 12th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research, Paris. 22-25 Sept.

Table des matières

INTRODUCTION	1
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. LA PIGMENTATION	4
A. Généralités sur la pigmentation des mammifères.....	4
B. Les gènes de coloration.....	5
C. Le système pigmentaire	10
1) La peau / les mélanocytes.....	10
2) Le mélanosome	12
3) Le transport des mélanosomes	15
4) Le transfert des mélanosomes	17
D. La mélanogénèse.....	23
1) Les mélanines.....	23
(a) Voie de synthèse des mélanines	23
(b) Rôle des pigments mélaniques	24
2) Régulation du système pigmentaire	26
(a) Rôle du récepteur MC1R.....	26
(b) Switch eumélanine/pheomélanine	26
II. LA FAMILLE TYROSINASE.....	28
A. Origine et structure des gènes	28
B. Régions promotrices	33
C. Structure des enzymes.....	33
1) Peptide signal	33
2) Cystéines et ponts disulfures	34
3) N-glycosylation.....	35
4) Domaine transmembranaire	37
5) Sites catalytiques et activité catalytique.....	39
D. Régulation des enzymes.....	41
1) Régulation transcriptionnelle	41
2) Maturation / calnexine.....	44
3) Glycosylation.	46
4) Adressage/transport au mélanosome	46
5) Fonctionnement en complexe.....	50
6) Phosphorylation.....	52

E.	Les mutants de la famille tyrosinase	52
1)	TYR.....	52
2)	TYRP1	53
3)	DCT.....	53
III.	LES BOVINS.....	54
A.	Généralités sur les races	54
B.	Les races étudiées	55
1)	La Normande.....	55
2)	La Limousine	56
3)	La Gasconne.....	57
4)	La Blonde d'Aquitaine.....	58
5)	La Salers.....	59
6)	La Maine-Anjou	60
7)	La Prim'Holstein.....	61
8)	La Charolaise	62
9)	La Montbéliarde.....	63
C.	La génétique de la coloration chez les bovins.....	64
IV.	PROJET D'ETUDE.....	69
	<i>MATERIELS ET METHODES</i>	<i>70</i>
I.	Matériel biologique	70
A.	Peau.....	70
B.	Anticorps.....	70
II.	Préparation d'acides nucléiques	70
A.	Préparations d'ARN totaux de peau.....	70
B.	Synthèse d'ADNc	72
III.	Préparation de protéines	72
A.	Extraction de protéines de peau	72
B.	Dosage des protéines.....	74
IV.	RT-PCR	74
A.	RACE-PCR.....	74
B.	RT-PCR classique.....	76
C.	RT-PCR semi quantitative.....	76
D.	Les oligonucléotides	78
V.	Electrophorèse d'acides nucléiques et purification	81

A.	Electrophorèse en gel d'agarose.....	81
B.	Purification de fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose	81
VI.	Séquençage	81
VII.	Western-Blot.....	82
A.	Electrophorèse en gel tricine-polyacrylamide.....	82
B.	Transfert actif sur membrane de nitrocellulose.....	84
C.	Hybridation	85
D.	Révélation.....	85
	RESULTATS DISCUSSION.....	86
I.	Clonage des ADNc des gènes de la famille tyrosinase	87
A.	Isolement des régions non codantes.....	87
B.	Amplification et séquençage de la partie codante des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> et <i>DCT</i>	87
1)	Amplification de la partie codante des gènes de la famille tyrosinase.....	87
2)	Analyse des séquences nucléotidiques des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> et <i>DCT</i>	89
3)	Analyse des séquences peptidiques déduites des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> et <i>DCT</i>	89
II.	Etude du polymorphisme des gènes de la famille tyrosinase.....	102
III.	Etude du gène <i>RAB38</i> bovin.....	104
A.	Clonage.....	104
1)	Définition des oligonucléotides.....	104
2)	Amplification et séquençage de la partie codante du gène <i>RAB38</i>	104
B.	Etude du polymorphisme du gène <i>RAB38</i> bovin.....	106
IV.	Etude de la régulation transcriptionnelle des gènes de la famille tyrosinase	108
A.	Caractérisation de transcrits alternatifs du gène <i>TYR</i>	108
B.	Etude de l'expression des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> et <i>DCT</i> par PCR	110
C.	Etude de l'expression des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> et <i>DCT</i> par RT-PCR semi-quantitative chez différentes races bovines	110
1)	Définition des amorces.....	110
2)	Niveaux d'expression chez différentes races	110
D.	Etude de l'expression des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> , <i>DCT</i> et <i>AGOUTI</i> par RT-PCR semi-quantitative chez la race Normande.....	115
1)	Etude préliminaire.....	115
2)	Etude approfondie	117
V.	Etude protéique par Western-Blot	121
	CONCLUSION PERSPECTIVES.....	122

BIBLIOGRAPHIE **125**

ANNEXE **140**

Table des illustrations

Figure 1 : Photo de mélanocytes en cultures (d'après (Bolognia et Orlow, 2003a)).....	9
Figure 2 : Localisation des mélanocytes au niveau de la peau humaine.	9
Figure 3 : Localisation des mélanocytes au niveau du follicule pileux (d'après (Aubin-Houzelstein et al., 1998)).	10
Figure 4 : Différents stades de maturation des mélanosomes (eumélanosomes) (de 1 à 4).	11
Figure 5 : Modèle schématique du transport des mélanosomes dans les mélanocytes épidermiques (d'après (Lambert et al., 1999)).	14
Figure 6 : Schéma du complexe tripartite, contenant melanophiline, Rab27a et myosine-Va , qui relie le mélanosome au réseau d'actine (d'après (Bahadoran et al., 2003)).	16
Figure 7 : Voie de synthèse des mélanines.	22
Figure 8 : Rôle de Mc1r dans la pigmentation.....	25
Figure 9 : Photo de poils Agouti de renard (d'après (Bolognia et Orlow, 2003b)).	25
Figure 10 : Structure du gène TYR humain.	27
Figure 11 : Structure du gène TYRP1 humain.....	27
Figure 12 : Structure du gène DCT humain.	28
Figure 13 : Comparaison des structures exon-intron des gènes de la famille tyrosinase (d'après (Sturm et al., 2001)).	29
Figure 14 : Présence de séquences répétées dans les gènes TYR, TYRP1 et DCT humains (d'après (Sturm et al., 2001)).	30
Figure 15 : Structure des transcrits alternatifs du gène DCT (d'après (Pisarra et al., 2000)).	31
Figure 16 : Structure des transcrits alternatifs du gène Tyr murins (d'après (Kelsall et al., 1997)).	32
Figure 17 : Modèle du site actif des tyrosinases de mammifères.	38
Figure 18 : Schéma de la régulation transcriptionnelle des gènes de la famille tyrosinase.	42
Figure 19 : Schéma du transport des protéines mélanosomales (d'après (Kushimoto et al., 2003)).	48
Figure 20 : Répartition de quelques mutations dans le gène TYR humain impliquées dans l'OCA1 (d'après http://albinismdb.med.umn.edu/oca1map.htm).	51
Figure 21 : Vache de race Normande.	55
Figure 22 : Vache de race Limousine.....	56
Figure 23 : Vache de race Gasconne.	57
Figure 24 : Taureau de race Blonde d'Aquitaine.....	58
Figure 25 : Vache de race Salers.	59
Figure 26 : Vaches de race Maine-Anjou.....	60
Figure 27 : Vache de race Prim'Holstein.	61
Figure 28 : Vache de race Charolaise.....	62
Figure 29 : Vache de race Montbéliarde.....	63

Figure 30 : Individu Angus atteint d'albinisme oculocutané (d'après http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html).....	67
Figure 31 : Veau albinos de race Prim'Holstein (d'après http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html) ..	67
Figure 32 : Veau albinos de race Brune (d'après http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html)	67
Figure 33 : Profil électrophorétique des ARN totaux de peau de quelques animaux du domaine du Pin-au-Haras.	71
Figure 34 : Schéma du principe d'isolement de la partie 5'UTR d'un transcrit.	73
Figure 35 : Schéma du principe d'isolement de la partie 3'UTR d'un transcrit.	75
Figure 36 : Schéma de la localisation des amorces sur les gènes TYR, TYRP1 et DCT.	80
Figure 37 : Schéma du montage de transfert des protéines en système semi-sec.....	83
Figure 38 : Exemple type d'amplification par RACE-PCR ; cas de l'obtention des régions 5' et 3' non traduites de DCT de la race Charolaise.	86
Figure 39 : Amplification de la partie codante des gènes TYR, TYRP1 et DCT chez la Prim'Holstein.....	86
Figure 40 : Structure de l'enzyme TYR bovine.	92
Figure 41 : Structure de l'enzyme TYRP1 bovine.	94
Figure 42 : Structure de l'enzyme DCT bovine.	96
Figure 43 : Alignement des séquences peptidiques des TYR bovines, humaines et murines.	97
Figure 44 : Alignement des séquences peptidiques des TYRP1 bovines, humaines et murines.....	99
Figure 45 : Alignement des séquences peptidiques des DCT bovines, humaines et murines.	100
Figure 46 : Amplification de la partie codante du gène RAB38 bovin chez différentes races bovines.	103
Figure 47 : Séquences de la partie codante du gène RAB38 et de la protéine RAB38 déduite.	105
Figure 48 : Comparaison de séquences entre les protéines RAB38 bovines et humaines.....	106
Figure 49 : Transcrits alternatifs du gène TYR isolés chez différentes races bovines.	107
Figure 50 : Expression différentielle des gènes TYR, TYRP1 et DCT chez différentes races bovines.....	109
Figure 51 : Niveau d'expression des gènes TYR, TYRP1 et DCT chez différentes races bovines.....	111
Figure 52 : Niveau d'expression du gène TYRP1 chez trois individus de la race Normande.	114
Figure 53 : Individus croisés Prim'Holstein/Normande utilisés pour l'analyse en RT-PCR semi-quantitative.	116
Figure 54 : Niveau d'expression des gènes TYR, TYRP1, DCT et AGOUTI dans différentes parties colorées d'individus croisés Prim'Holstein/Normande.....	118
Figure 55 : Profil électrophorétique d'extraits protéiques de peau colorés au Bleu de Coomassie.	120
Figure 56 : Autoradiographie de protéines de peaux bovines et humaines hybridées avec α -PEP1h.	120

Table des tableaux

Tableau 1 : Gènes de coloration murins clonés.	8
Tableau 2 : Résidus conservés définissant les sites catalytiques des enzymes de la famille tyrosinase.	39
Tableau 3 : Génotypes au locus <i>EXTENSION</i> chez les races bovines (d'après (Rouzaud et al., 2000; Maudet et Taberlet, 2002)).	65
Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage.	79
Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR semi-quantitative.	80
Tableau 6 : Structure des gènes <i>TYR</i> , <i>TYRP1</i> et <i>DCT</i> humains et bovins.	88
Tableau 7 : Tailles des différentes enzymes et conservation (pourcentages d'identités) entre plusieurs espèces.	97
Tableau 8 : Polymorphismes observés chez les bovins.	101

INTRODUCTION

La pigmentation de la peau, des poils, des cheveux ou des yeux est un des caractères les plus directement accessibles à l'observateur tant chez l'Homme que chez les animaux. L'attrance que ce trait suscite est valable aussi bien pour le commun des mortels que pour les scientifiques. Ainsi, depuis de très nombreuses années, les chercheurs se sont attachés à élucider les mystères de cette coloration parfois fascinante ou intrigante.

Il est désormais bien établi que chez les mammifères, la pigmentation est définie principalement par la distribution ainsi que les quantités relatives de deux pigments, la phéomélanine et l'eumélanine, qui produisent respectivement des colorations rouge/jaune et marron/noire (Hearing et Tsukamoto, 1991; Jackson, 1993). Les mélanines sont synthétisées dans des organites spécialisés, les mélanosomes, au sein des mélanocytes, cellules épidermiques dérivées de la crête neurale (Silvers, 1979).

Les premières connaissances cellulaires sur la formation des pigments ont servi de point de départ aux études génétiques de la pigmentation. Dès lors, la question de savoir comment les gènes qui déterminent la coloration interagissent et produisent leurs effets va constituer le fil conducteur d'un grand nombre de recherches en pleines expansions aujourd'hui.

La pigmentation a souvent servi à définir les races qui forment les espèces animales mais aussi les différents groupes ethniques humains.

Ces dernières années, on a vu s'accroître le besoin en traçabilité des produits d'origine bovine, tant de la part des professionnels que des consommateurs. Avec les différentes « crises de la vache folle » notamment, un sentiment d'insécurité alimentaire a grandi au sein de la population, rendant de plus en plus pressant la nécessité de disposer d'outils fiables pour contrôler la filière bovine dans ses différents aspects. D'autre part, les éleveurs et les professionnels en charge de la protection et de la promotion des races bovines françaises (UPRA) manifestent le souci de protéger les intérêts de leur race vis-à-vis des politiques de croisement parfois douteuses pratiquées dans certains pays. S'inscrivant parfaitement dans le cadre des attentes des professionnels et des consommateurs, l'équipe Coloration de l'UMR1061, au sein de laquelle j'ai effectué mon doctorat, s'attache à mettre au point des outils moléculaires utilisables dans des applications de traçabilité des produits d'origine bovine. Notre démarche repose sur l'étude des bases moléculaires responsables du patron de coloration de la robe des bovins. L'idée maîtresse de cette stratégie est que chaque race bovine a une couleur de robe qui lui est propre, cette couleur étant le fruit d'un travail de sélection parfois très ancien. Il en résulterait des bases moléculaires spécifiques impliquées

dans la définition de la pigmentation de chaque race bovine. La découverte de ces bases permettra de mettre au point des outils visant, par exemple, à garantir l'origine raciale de n'importe quel produit issu de la filière bovine. D'autre part, la caractérisation génétique des races bovines françaises contribuerait à une définition encore plus précise des standards raciaux via par exemple l'inscription de ces particularités génétiques dans le Herd-Book de chaque race. Ainsi, n'importe quel individu issu de croisement et ayant un phénotype pigmentaire ressemblant à celui d'une race pure pourrait être identifié et écarté des schémas de sélection.

La thématique développée au laboratoire revêt aussi un aspect plus fondamental. La génétique de la pigmentation des mammifères constitue un modèle d'étude de la signalisation cellulaire et de la régulation des gènes. L'intérêt de l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la couleur de la peau, des poils ou cheveux et des yeux dépasse largement le cadre même de la pigmentation et fournit des connaissances sur les processus fondamentaux du développement des vertébrés et sur l'origine et l'évolution de certaines maladies humaines comme les mélanomes. L'étude de la pigmentation de la robe chez les bovins peut donc revêtir des intérêts variés et insoupçonnés.

Au sein de l'équipe, deux thèses antérieures se sont intéressées aux acteurs majeurs du contrôle en amont de la synthèse des pigments, les gènes *AGOUTI* et *EXTENSION*. Les travaux présentés dans cette thèse concernent plus particulièrement les acteurs qui, *in fine*, participent directement à la synthèse des pigments, à savoir les trois gènes de la famille tyrosinase : *TYROSINASE*, *TYROSINASE-RELATED PROTEIN 1* et *DOPACHROME TAUTOMERASE*.

La première partie de ce manuscrit consiste à dresser l'état de l'art des connaissances bibliographiques. Après quelques données d'ordre général sur la pigmentation des mammifères, un panorama des gènes connus impliqués dans la définition de la couleur sera ensuite présenté. Puis, le système pigmentaire sera décrit sous un aspect cellulaire. Enfin, la synthèse des pigments et sa régulation seront abordés. Le deuxième chapitre décrira les caractéristiques des gènes et des enzymes de la famille tyrosinase. Les questions de régulation seront ensuite abordées ainsi que les dérèglements occasionnés dans le cas de diverses mutations. Le troisième chapitre présentera quelques caractéristiques de la génétique de la coloration chez les bovins ainsi que les différentes races étudiées. La deuxième partie de

l'exposé présentera les moyens et techniques employées dans cette étude. Ensuite, la troisième partie consistera en la présentation et la discussion des résultats obtenus. Un premier chapitre est consacré au clonage et à l'analyse aux niveaux génique et protéique des membres de la famille tyrosinase bovine. Les chapitres suivants traiteront tour à tour de l'analyse du polymorphisme des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* et du clonage ainsi que de l'analyse du polymorphisme du gène *RAB38* bovin. Ensuite, divers résultats concernant la régulation transcriptionnelle des gènes de la famille tyrosinase seront présentés et discutés. Le dernier chapitre sera, lui, consacré à des résultats obtenus au niveau protéique. Finalement, la dernière partie s'attachera à présenter les conclusions et perspectives qui découlent de ces travaux.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA PIGMENTATION

A. Généralités sur la pigmentation des mammifères

Depuis des temps anciens, les gens se sont intéressés aux variations de couleur entre les différents animaux et les ont perpétuées pour ces caractères. Par exemple, la mutation albino (*Tyr^c*) était déjà connue et « entretenue » chez la souris au temps des Grecques et des Romains et a été le premier caractère mammalien à être analysé après la redécouverte des principes de Mendel en 1900. Le livre de Silvers (Silvers, 1979) a été la pierre angulaire de l'analyse systématique et rigoureuse des souris présentant des anomalies de pigmentation. L'étude de ces souris mutantes a grandement contribué à la compréhension des rôles fonctionnels de gènes précis dans la peau et la biologie du mélanocyte.

L'origine du nom mélanine, du grec melanos (sombre), n'est pas claire mais est habituellement attribuée au chimiste suédois Berzélius (Berzelius, 1840).

Afin que la pigmentation fonctionne correctement, des événements et des interactions complexes doivent avoir lieu avec précision au cours du développement et de la différenciation. Dans la crête neurale tout d'abord, les mélanoblastes doivent se différencier correctement, puis ils doivent recevoir au bon moment le signal pour débiter leur migration vers leurs destinations finales. Pour parvenir à une pigmentation uniforme, les mélanoblastes doivent non seulement se disperser correctement mais également se différencier en mélanocytes qui à leur tour doivent fonctionner de manière appropriée. Les signaux nécessaires pour déclencher tous ces événements dépendent de l'expression d'un certain nombre de gènes des mélanoblastes et/ou mélanocytes, mais aussi d'autres types cellulaires. C'est ainsi que les motifs de pigmentation dans la peau et les poils peuvent dépendre des kératinocytes, et les gènes qui contrôlent la différenciation de ces derniers peuvent avoir des effets indirects sur la coloration.

B. Les gènes de coloration

Les loci affectant la pigmentation d'un animal, plus spécifiquement les poils, la peau et/ou les yeux, sont appelés gènes de coloration. Cela exclut les effets qui n'impliquent pas le système pigmentaire, par exemple une couleur de peau pâle à cause d'une anémie.

L'animal modèle d'étude des gènes de coloration est bien évidemment la souris. En 1979, Silvers nota dans son livre référence « The Coat Colors of Mice » l'existence de 130 mutations (allèles) au niveau de 50 loci (Silvers, 1979). Aujourd'hui, 800 allèles associés à des phénotypes (Mouse Genome Informatics accessible à <http://www.informatics.jax.org/> et Coat Color Genes accessible à <http://ifpcs.med.umn.edu/micemut.htm>) appartenant à 127 loci ont été décrits chez la souris. Parmi ceux-ci, 59 ont été clonés et séquencés (Nakamura *et al.*, 2002; Bennett et Lamoreux, 2003) (Tableau 1). Leur nombre s'accroît actuellement rapidement grâce aux banques de données de séquence des génomes humains et murins. A ce jour, tous les gènes de coloration clonés chez l'Homme ou la souris ont un orthologue chez les autres espèces (Mouse Genome Informatics accessible à <http://www.informatics.jax.org/>, Online Mendelian Inheritance in Man accessible à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM> et Coat Color Genes accessible à <http://ifpcs.med.umn.edu/micemut.htm>) et on peut penser que la plupart d'entre eux sont communs à tous les mammifères. La correspondance avec les autres vertébrés est plus faible, quoique large (Rawls *et al.*, 2001).

La multitude de gènes décrits peut être classée en différentes catégories en se basant sur leur niveau d'action et/ou en fonction du moment où ils sont requis. Ainsi, certains interviennent dans le développement du mélanocyte, d'autres dans le transport des constituants du mélanosome ou encore dans le transport du mélanosome lui-même.

La synthèse des mélanines en soi est assurée par l'activité de trois enzymes, Tyr, Tyrp1 et Dct, produits des gènes communément appelés locus *albino*, *brown* et *slaty* respectivement. Les activités de ces enzymes sont elles-mêmes contrôlées par le récepteur Mc1r et ses ligands antagonistes, α -MSH et Agouti. La qualité et la quantité des pigments synthétisés dépendent directement de l'activité de ces trois enzymes. Tout défaut de l'une d'entre elles a des répercussions le plus souvent visible sur la pigmentation de l'individu concerné.

Exposé Bibliographique

Symbole (ancien symbole)	Nom (ancien Nom)	Chromosome	Fonction	Symbole Humain	Chromosome Humain	Syndrome
(a) Développement du mélanocyte						
<i>Adam17</i>	A disintegrin and metalloprotease domain 17	12	Protéase, maturation de différentes protéines	<i>ADAM17</i>	2p25	N
<i>Adams20 (bt)</i>	A disintegrin and metalloprotease domain (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20 (belted)	15	Métalloprotéase. migration du mélanoblaste ?	<i>ADAMTS20</i>	12q12	N
<i>Brcal</i>	Breast cancer 1	11	Développement d'organes divers; suppresseur de tumeur	<i>BRCA1</i>	17q21	BC
<i>Eda (Ta)</i>	Ectodysplasin-A (tabby)	X	Glande sébacée, morphogenèse des dents et des poils	<i>EDI</i>	Xq12-q13	EDA/HED
<i>Edn3 (ls)</i>	Endothelin 3 (lethal spotting)	2	Facteur de croissance et de différenciation	<i>EDN3</i>	20q13	HD, WSS
<i>Ednrb (s)</i>	Endothelin receptor type B (piebald spotting)	14	Récepteur de facteur de croissance	<i>EDNRB</i>	13q22	HD, WSS
<i>Egfr (Dsk5)</i>	Epidermal growth factor receptor (dark skin 5)	11	Récepteur de facteur de croissance	<i>EGFR</i>	7p12.3	N
<i>Fgfr2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	7	Récepteur de facteur de croissance	<i>FGFR2</i>	10q26	CrS, PFS
<i>Ikbkg</i>	Inhibitor of B kinase, subunit (NEMO)	X	I B kinase. Requis pour la signalisation par NF B	<i>IKBKG</i>	Xq28	IP, HED-ID, EDA-ID
<i>Kit (W)</i>	Kit oncogene (white spotting)	5	Récepteur de facteur de croissance	<i>KIT</i>	4q11-q12	PS
<i>Kitl (Sl)</i>	Kit ligand (steel)	10	Facteur de croissance et de différenciation	<i>KITLG</i>	12q22	N
<i>Krt2-17 (Dsk2)</i>	Keratin 2-17 (dark skin 2)	15	Cytoskelette	<i>KRT2A</i>	12q11-q13	IBS
<i>Lmx1a (dr)</i>	LIM homeobox transcription factor 1 (dreher)	1	Facteur de transcription	<i>LMX1A</i>	1q22-23	N
<i>Mcoln3 (Va)</i>	Mucolipin 3 (varitint-waddler)	3	Canal cation	<i>MCOLN3</i>	1p22.3	N
<i>Mitf (mi)</i>	Microphthalmia-associated transcription factor (microphthalmia)	6	Facteur de transcription	<i>MITF</i>	3p12-14	WS2
<i>Pax3 (Sp)</i>	Paired box gene 3 (splotch)	1	Facteur de transcription	<i>PAX3</i>	2q35	WS1, WS3
<i>Sfxn1 (f)</i>	Sideroflexin 1 (flexed tail)	13	Transporteur de Tricarboxylate	<i>SFXN1</i>	5q35.3	N
<i>Snai2</i>	Snail homolog 2/Slug	16	Facteur de transcription	<i>SNAI2</i>	8q11	WS2
<i>Sox10 (Dom)</i>	SRY-box containing gene 10 (dominant megacolon)	15	Facteur de transcription	<i>SOX10</i>	22q13.1	WSS
<i>Sox18 (rg, Dcc1)</i>	SRY-box containing gene 18 (ragged, dark coat color 1)	2	Facteur de transcription	<i>SOX18</i>	20q13.33	N
<i>Wnt1</i>	Wingless-related MMTV integration site 1	15	Facteur de croissance/morphogène	<i>WNT1</i>	12q13	N
<i>Wnt3a</i>	Wingless-related MMTV integration site 3A	11	Facteur de croissance/morphogène	<i>WNT3A</i>	1q42	N

(b) Composants des mélanosomes

<i>Dct (slt)</i>	Dopachrome tautomerase (slaty)	14	Enzyme mélanosomale	<i>DCT</i>	13q31-q32	N
<i>Gpnmb</i>	Glycoprotein (transmembrane) NMB	6	Composant du mélanosome apparent	<i>GPNMB</i>	7p15	N
<i>Matp (uw)</i>	Membrane-associated transporter protein (underwhite)	15	Transporteur supposé	<i>MATP</i>	5p	OCA4
<i>Rab38 (cht)</i>	RAB38, member RAS oncogene family (chocolate).	7	Adressage de Tyrp1	<i>RAB38</i>	11q14	N
<i>Si (si)</i>	Silver (silver)	10	Matrice du mélanosome	<i>SILV</i>	12q13-q14	N
<i>Tyr (c)</i>	Tyrosinase (color, albino)	7	Enzyme mélanosomale	<i>TYR</i>	11q21	OCA1
<i>Tyrp1 (b)</i>	Tyrosinase-related protein 1 (brown)	4	Enzyme mélanosomale	<i>TYRP1</i>	9p23	OCA3

(c) Construction du mélanosome /transport des protéines (HPS-related)

<i>Ap3b1 (pe)</i>	Adaptor-related protein complex AP-3, 1 subunit (pearl)	13	Transport des protéines d'organite	<i>AP3B1 [HPS2]</i>	15q15	HPS
<i>Ap3d (mh)</i>	Adaptor-related protein complex AP-3, subunit (mocha)	10	Transport des protéines d'organite	<i>AP3D1</i>	19p13.3	N
<i>Vps33a (bf)</i>	Vacuolar protein sorting 33a (buff)	5	Transport des protéines d'organite	<i>VPS33A</i>	12q24.31	N
<i>cno (cno)</i>	Cappuccino	5	Biogenèse d'organites	<i>CNO</i>	4p16-p15	N
<i>Hps1 (ep)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (pale ear)	19	Biogenèse d'organites et taille	<i>HPS1</i>	10q24	HPS
<i>Hps3 (coa)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (cocoa)	3	Biogenèse d'organites	<i>HPS3</i>	3q24	HPS
<i>Hps4 (le)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog (light ear)	5	Biogenèse d'organites et taille	<i>HPS4</i>	22q11-q12	HPS
<i>Hps5 (ru2)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 5 homolog (ruby-eye 2)	7	Biogenèse d'organites	<i>HPS5</i>	11p14	HPS
<i>Hps6 (ru)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 6 homolog (ruby-eye)	19	Biogenèse d'organites	<i>HPS6</i>	10q24.31	HPS
<i>Lyst (bg)</i>	Lysosomal trafficking regulator (beige)	13	Biogenèse d'organites et taille	<i>LYST</i>	1q42	CHS
<i>Muted (mu)</i>	Muted (muted)	13	Biogenèse d'organites	<i>MU</i>	6p25-p24	N
<i>Oa1</i>	Mouse homolog of human ocular albinism 1 (Nettleship-Falls)	X	Biogenèse d'organites et taille	<i>OAI</i>	Xp22.3	OA
<i>p</i>	Pink-eyed dilution	7	Transport du glutathion dans le RE ?. Maturation et transport de protéines mélanosomales.	<i>P</i>	15q11-q12	OCA2
<i>Pldn (pa)</i>	Pallidin (pallid)	2	Biogenèse d'organites	<i>PLDN</i>	15q15.1	N
<i>Rabggta (gm)</i>	Rab geranylgeranyl transferase, subunit (gunmetal)	14	Biogenèse d'organites	<i>RABGGTA</i>	14q11.2	Ch

(d) Transport du mélanosome

<i>Mlph (ln)</i>	Melanophilin (leadon)	1	Transport du mélanosome	<i>MLPH</i>	2q37	N
<i>Myo5a (d)</i>	Myosin Va (dilute)	9	Transport du mélanosome	<i>MYO5A</i>	15q21	GS
<i>Myo7a (sh-1)</i>	Myosin VIIa (shaker-1)	7	Transport du mélanosome (rétine pigmentée)	<i>MYO7A</i>	11q13.5	US 1B
<i>Rab27a (ash)</i>	RAB27A, member RAS oncogene family (ashen)	9	Transport du mélanosome	<i>RAB27A</i>	15q15-q21	GS

(e) Eumélanine et pheomélanine						
<i>a</i>	Non-agouti	2	Switch eumélanine/pheomélanine	<i>ASIP</i>	20q11.2	N
<i>Atrn (mg)</i>	Attractin (mahogany)	2	Switch eumélanine/pheomélanine (entre autres)	<i>ATRN</i>	20p13	N
<i>Ggt1</i>	Glutamyltranspeptidase 1	10	Métabolisme du glutathion (synthèse pheomélanine)	<i>GGT loci</i> (plusieurs)	22q11	GU
<i>Gl</i>	Grey-lethal	10	Pheomélanine et fonction de l'ostéoclaste	<i>GL</i>	6q21	SRO
<i>Mc1r (e)</i>	Melanocortin 1 receptor (extension)	8	Switch eumélanine/pheomélanine (entre autres)	<i>MC1R</i>	16q24.3	RH
<i>Mgrn1 (md)</i>	Mahogunin, ring finger 1 (mahoganoid)	16	Couleur des mélanines, rôle CNS. E3 ubiquitin ligase	<i>MGRN1</i>	16p13.3	N
<i>Pomc1</i>	Pro-opiomelanocortin-	12	Eumélanine/pheomélanine (et endocrine)	<i>POMC</i>	2p23.3	O and RH
(f) Effets systémiques						
<i>Atp7a (Mo)</i>	ATPase, Cu ²⁺ transporting, polypeptide (mottled)	X	Transport du cuivre	<i>ATP7A</i>	Xq13.2- q13.3	MD
<i>Atp7b (tx)</i>	ATPase, Cu ²⁺ transporting, polypeptide (toxic milk)	8	Transport du cuivre	<i>ATP7B</i>	13q14-q21	WD
<i>Bcl2</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2	1	Inhibiteur de l'apoptose	<i>BCL2</i>	18q21.3	BCL
<i>Ercc2</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	7	Réparation de l'ADN	<i>ERCC2</i>	19q13	XPD, TTD, CS

Tableau 1: Gènes de coloration murins clonés.

N: none known, BC: breast cancer, BCL: B-cell lymphoma, Ch: choroideremia, CHS: Chediak-Higashi syndrome, CS: Cockayne syndrome, CrS: Crouzon syndrome, EDA: ectodermal dysplasia, anhidrotic, EDA-ID: EDA with immune deficiency, GS: Griscelli syndrome, GU: Glutathionuria, HED: hypohidrotic ectodermal dysplasia, HED-ID: HED with immune deficiency, HPS: Hermansky-Pudlak syndrome, HD: Hirschsprung disease, HSS: Hirschsprung-Shah syndrome, IBS: ichthyosis bullosa of Siemens, IP: incontinentia pigmenti, MD: Menke's disease, O: obesity, OA: ocular albinism, OCA1-4: oculocutaneous albinism types 1-4, Pfs: Pfeiffer syndrome, PS: piebald syndrome, RH: red hair (included although not a defect), SRO: severe recessive osteopetrosis, TTD: trichothiodystrophy, US 1B: Usher syndrome, type 1B, WD: Wilson disease, WS1-3: Waardenburg syndrome types 1-3, WSS: Waardenburg-Shah syndrome (Waardenburg syndrome type 4), XPD: xeroderma pigmentosum, group D. (d'après (Bennett et

Lamoreux, 2003))

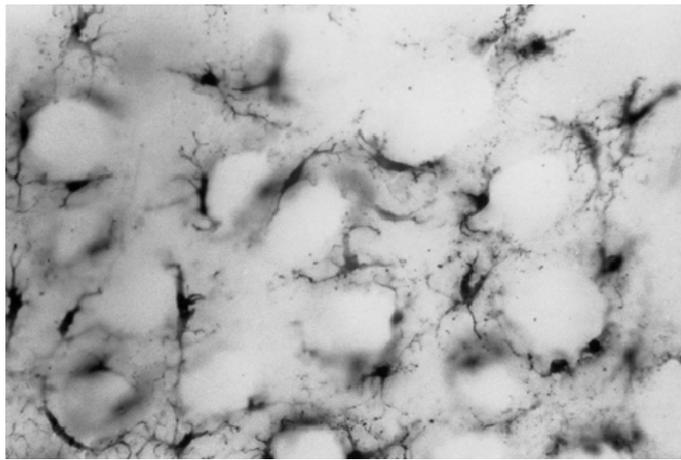


Figure 1 : Photo de mélanocytes en cultures (d'après (Bolognia et Orlow, 2003a)).

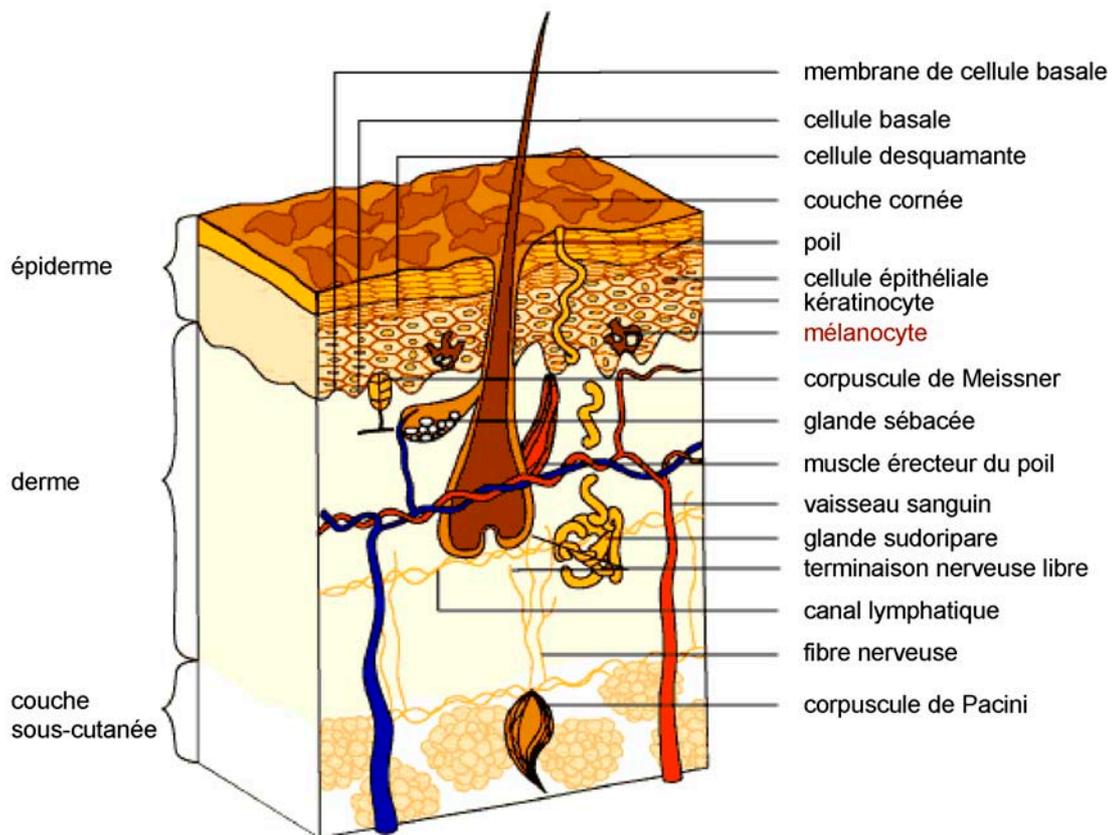


Figure 2 : Localisation des mélanocytes au niveau de la peau humaine.

C. Le système pigmentaire

1) La peau / les mélanocytes

La fonction biologique du système pigmentaire chez les mammifères est de produire un biopolymère, la mélanine, qui absorbe la lumière. Cette synthèse se déroule à l'intérieur de cellules spécialisées, les mélanocytes épidermiques, oculaires et folliculaires (Nordlund *et al.*, 1998). Les mélanocytes de la peau sont situés dans la couche basale entre le derme et l'épiderme et possèdent de nombreux prolongements dendritiques qui s'insèrent entre les kératinocytes environnants (Figure 1 et Figure 2). Les mélanocytes des follicules pileux sont eux situés au sommet de la papille dermique (Figure 3).

Tous les mélanocytes, sauf ceux de l'épithélium pigmentaire rétinien (ERP), dérivent de la crête neurale, sur la partie dorsale de l'embryon, et migrent à travers le corps jusqu'à leur destination finale. Les mélanocytes de l'ERP se développent à partir du neuroectoderme invaginé de la coupe optique. En dépit des nombreux processus en commun avec les mélanocytes de la crête neurale, il existe de nombreuses différences dans leur réponse aux mutations (par exemple, les mutations *dilute* ne touchent pas les mélanocytes oculaires).

L'unité fonctionnelle qui produit et distribue les mélanines au niveau de la peau est composée d'un mélanocyte et d'approximativement 36 kératinocytes voisins (Jimbow, 1995).

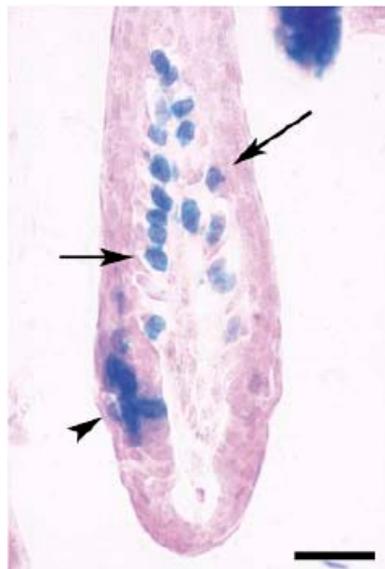


Figure 3 : Localisation des mélanocytes au niveau du follicule pileux (d'après (Aubin-Houzelstein *et al.*, 1998)).

Coupe d'un follicule pileux Tyr^c/Tyr^c $Kit^{W-lacZ}/+$. Les mélanocytes sont indiqués par des flèches. Echelle : 25 μ m

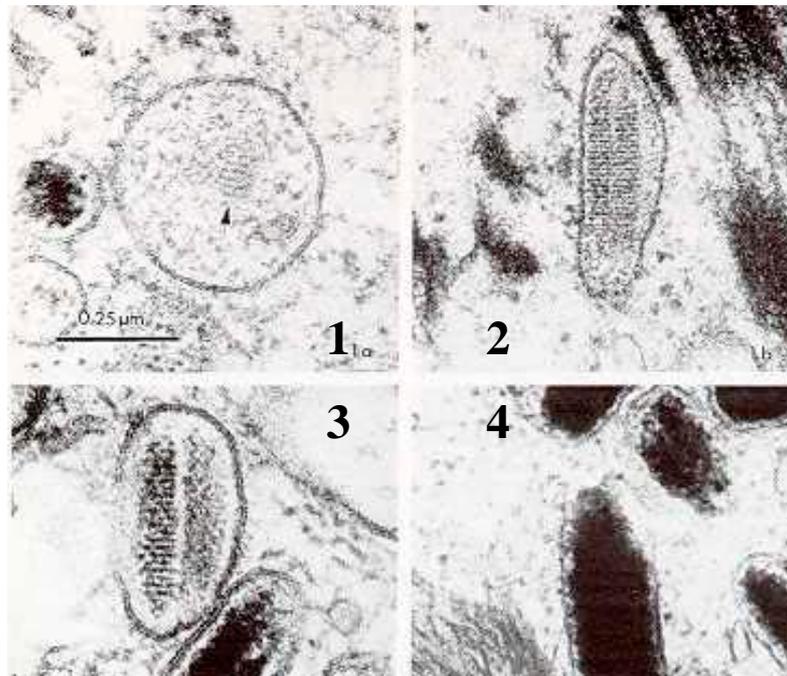


Figure 4 : Différents stades de maturation des mélanosomes (eumélanosomes) (de 1 à 4).

2) Le mélanosome

La synthèse des pigments par les mélanocytes se déroule dans des vésicules spécialisées appelées mélanosomes. Ces derniers sont transférés aux kératinocytes qui les déposent au niveau des poils en croissance. C'est l'étude et la caractérisation des protéines contenues ou formant l'organite mélanosomal qui ont fournies les explications biochimiques de certaines couleurs de pelage chez les animaux et de nombreux cas d'albinisme chez l'Homme.

L'examen ultrastructural des mélanocytes révèle que les mélanosomes sont des petits organites apparentés aux lysosomes. Ils sont produits à partir du réseau golgien et du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Les mélanosomes mûrissent et se pigmentent au cours de leur transport le long des digitations dendritiques jusqu'à leur transfert aux kératinocytes environnant de la peau et du follicule pileux. En revanche, les mélanocytes de l'œil ne sécrètent pas leurs mélanosomes mais les retiennent dans leur cytosol (Nordlund *et al.*, 1998). Deux grands types de mélanosomes sont produits et nommés conformément au type de mélanine qu'ils contiennent :

l'eumélanosome est grand (environ 0,9 X 0,3 μm) et ellipsoïdal et possède une matrice glycoprotéique hautement structurée indispensable à la production de pigments eumélaniques marron/noir,

les pheomélanosomes sont plus petits et sphériques (environ 0,7 μm de diamètre), composés d'une matrice de glycoprotéines plus lâche et désorganisée où se déroule la synthèse de pheomélanines jaune/rouge.

La maturation du mélanosome comporte quatre stades (Figure 4). Le premier est commun à l'eumélanogénèse et à la pheomélanogénèse et provient d'endosomes tardifs issus du réticulum endoplasmique (RE). Cependant, dans les stades suivants, les eumélanosomes sont toujours ellipsoïdaux alors que les pheomélanosomes restent sphériques. Les eumélanosomes de stade II exhibent une structure interne très organisée qui au fil du stade III se charge d'un dépôt régulier et périodique de mélanine opaque. Finalement, les eumélanosomes de stade IV sont si mélanisés que leur structure interne devient invisible. Les pheomélanosomes, quant à eux, contiennent seulement du matériel granulaire pendant les quatre stades de la maturation mélanosomale.

Lors de la biogénèse du mélanosome, la protéine GP100 (Silver) y est adressée précocement au stade I. D'autres protéines mélanosomales y sont également adressées de

façon précoce (Kushimoto *et al.*, 2001). Cependant, ces protéines sont rapidement dégradées ou partiellement clivées, probablement à cause de la nature hautement protéolytique de certaines enzymes présentes dans ce milieu (Diment *et al.*, 1995). Cette dégradation détruit en particulier la fonction catalytique des enzymes TYR et DCT et inhibe la synthèse des mélanines. Dans le cas de GP100, ce clivage protéolytique est nécessaire à la maturation de la protéine, d'une forme ancrée à la membrane à une forme « libre » qui devient un composant du matériel fibrillaire du mélanosome (Kushimoto *et al.*, 2001). Le clivage et la maturation de GP100 s'accompagnent de la restructuration du mélanosome précoce, de vésicules rondes amorphes (stade I) à l'apparition de structures fibrillaires allongées (stade II). C'est seulement après la transition en stade II que les enzymes deviennent résistantes à la protéolyse et que la production de mélanines commence.

D'autres enzymes conditionnent la maturation du mélanosome. Ainsi, l'enzyme tyrosinase qui a une glycosylation post-traductionnelle caractéristique, joue un rôle autant dans la biogenèse des eumélanosomes que dans celle des pheomélanosomes alors que les enzymes Tyrp1 et Dct sont exclusives de l'eumélanosome. Cependant, il est spéculé depuis longtemps que Tyrp1 joue un rôle dans la morphologie du mélanosome (Rittenhouse, 1968). Ainsi, on observe une régression des mélanocytes du follicule pileux à la fin du cycle du poil chez des souris *Tyrp1^{B-lt}* (Johnson et Jackson, 1992) et la présence d'une structure interne désorganisée dans les mélanosomes de stade III chez les souris *Tyrp1^B* (Hirobe et Abe, 1999).

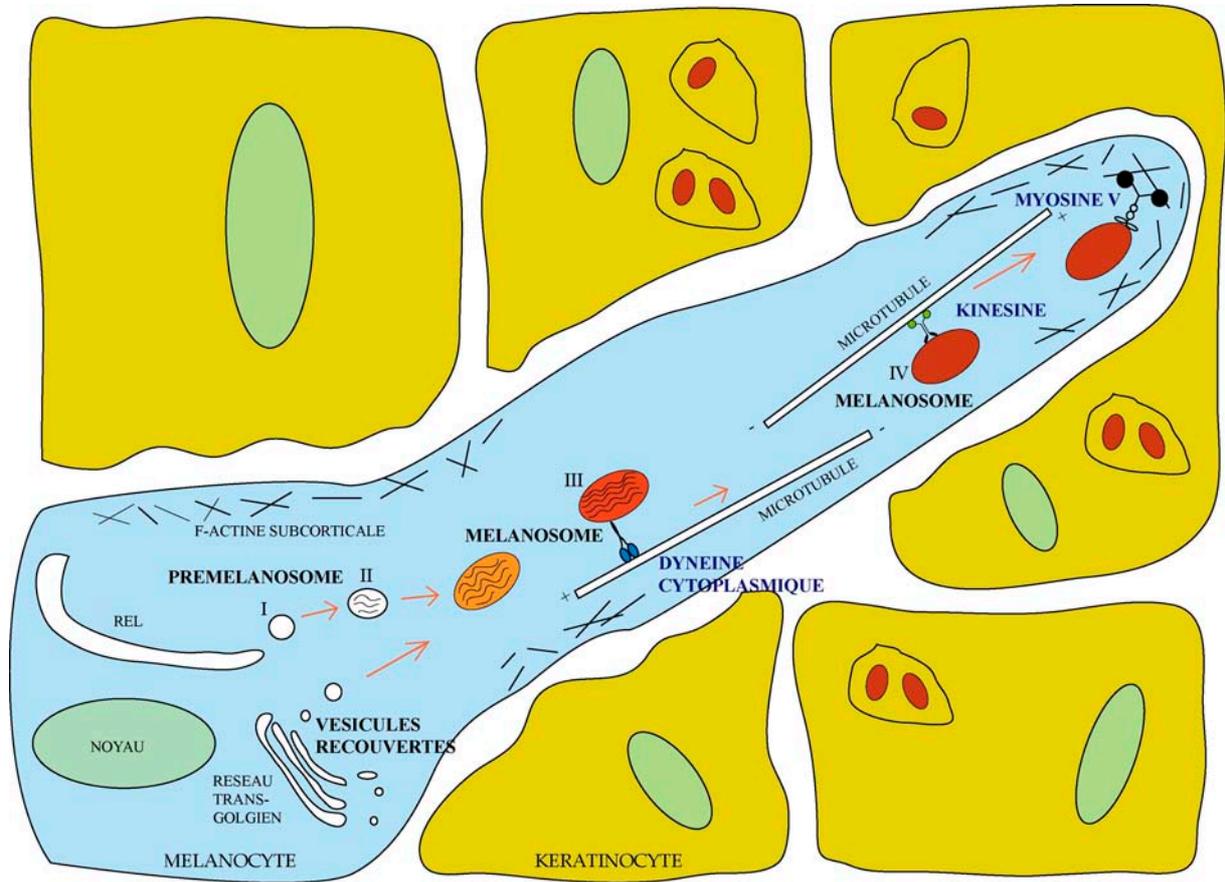


Figure 5: Modèle schématique du transport des mélanosomes dans les mélanocytes épidermaux (d'après (Lambert *et al.*, 1999)).

3) Le transport des mélanosomes

Pendant que le mélanosome mature et se remplit de mélanines, il est transporté vers les extrémités dendritiques des mélanocytes en vue de son transfert aux cellules voisines (Figure 5). Les dendrites mélanocytaires sont constituées d'un cœur central de microtubules et d'un réseau périphérique d'actine subcortical (Lacour *et al.*, 1992). Dans le modèle actuellement proposé, les microtubules médieraient le transport longue distance et le réseau d'actine, le transport de proximité et le transfert (Kelleher et Titus, 1998; Rodionov *et al.*, 1998; Rogers et Gelfand, 1998; Wu *et al.*, 1998). La kinésine et la dynéine cytoplasmique pourraient être impliquées dans le transport des mélanosomes sur de longues distances le long des microtubules, sûrement grâce à des mouvements antérogrades et rétrogrades comme décrit chez la souris. En fonction de l'orientation (polarité) du microtubule, deux scénarios sont envisageables : la kinésine pourrait assurer le mouvement antérograde et la dynéine cytoplasmique le mouvement inverse (polarité uniforme), ou alors, les deux moteurs protéiques pourraient collaborer dans les deux directions (la Figure 5 présente la polarité mixte).

La myosine V est probablement impliquée dans la capture des mélanosomes en périphérie et dans le transfert via le réseau subcortical d'actine. De nombreuses preuves du rôle du moteur actine-dépendant Myosin-Va dans la pigmentation viennent de l'observation de la dilution de la coloration chez les mutants murins *dilute* et les patients atteints du syndrome autosomique récessif de Griscelli (Griscelli *et al.*, 1978), causé par des mutations au locus *myosin Va* (Pastural *et al.*, 1997). Morphologiquement, dans les mélanocytes de ces individus, on peut observer que les mélanosomes, qui par ailleurs ont une morphologie et une maturation normale, s'accumulent dans la périphérie du noyau. Ce défaut de transport des mélanosomes à leur destination finale, la périphérie de l'extrémité des dendrites et donc les kératinocytes environnants, conduit à une hypopigmentation. Chez certains patients atteints de ce même syndrome, des mutations causales ont été observées dans le gène *RAB27A* (*ashen*), codant une GTPase (Menasche *et al.*, 2000). De nombreuses observations suggèrent que *RAB27A* serait requis pour la capture des mélanosomes médiée par Myosin-Va (Bahadoran *et al.*, 2001; Hume *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001), probablement en permettant le recrutement de cette myosine sur la surface du mélanosome ou en servant de « récepteur » MYO5A (Wu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002a).

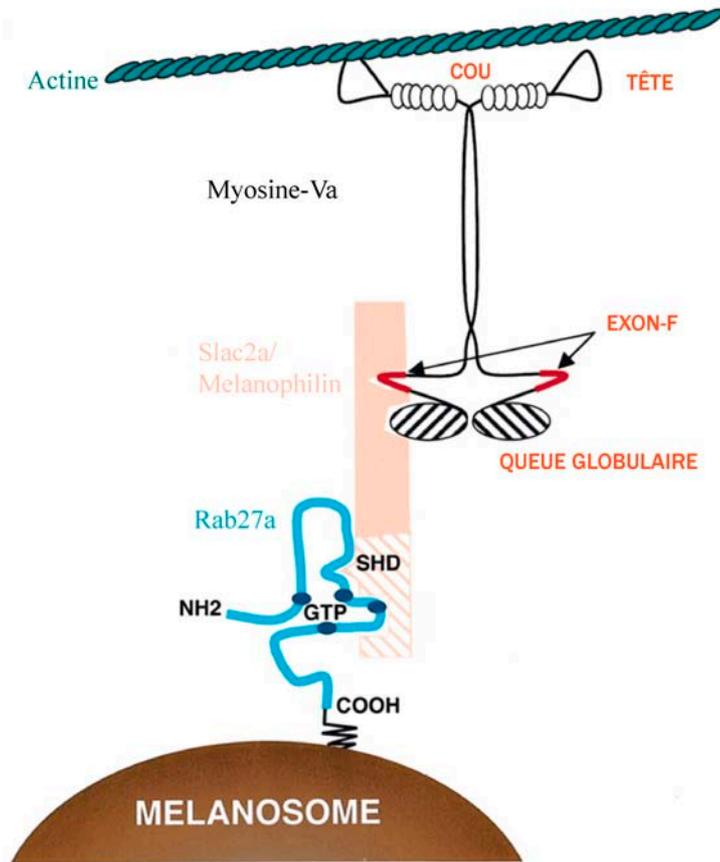


Figure 6 : Schéma du complexe tripartite, contenant melanophiline, Rab27a et myosine-Va , qui relie le mélanosome au réseau d'actine (d'après (Bahadoran *et al.*, 2003)).

Récemment, le gène muté chez les souris *leaden*, qui présentent le même patron de couleur que les souris *ashen* et *dilute*, a été découvert. Le locus *leaden* code une protéine synaptotagmin-like, Mlph (melanophiline) (Matesic *et al.*, 2001). Cependant, aucune maladie humaine n'est liée à des mutations *MLPH*. Des études très récentes ont montré que melanophiline, aussi appelée Slac2a, interagit par son domaine N-terminal avec Rab27a alors que son domaine C-terminal interagit avec la myosine-Va (Fukuda *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2002; Strom *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002b). De plus, il a été montré que l'interaction de myosine-Va et melanophiline dépend de la présence de l'exon alternatif F dans la queue globulaire C-terminale de myosine-Va, exprimé dans les mélanocytes (Wu *et al.*, 2002a; Wu *et al.*, 2002b). Ainsi, melanophiline, Rab27a et myosine-Va forment un complexe tripartite qui contrôle le transport distal du mélanosome et l'adressage aux dendrites (Figure 6) (Bahadoran *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2003).

La détermination de l'orientation exacte des microtubules dendritiques éclairera le rôle des moteurs protéiques liés à ces structures (Lambert *et al.*, 1999).

La protéine Pallidin et son ligand syntaxin 13 (membre de la famille des SNAREs) sont également suspectés d'intervenir dans la biogenèse du mélanosome (Falcon-Perez et Dell'Angelica, 2002).

4) Le transfert des mélanosomes

Les acteurs et les mécanismes impliqués dans le transfert des mélanosomes aux kératinocytes environnants sont très peu connus. Trois modes de transfert des mélanosomes ont été proposés (Okazaki *et al.*, 1976; Yamamoto et Bhawan, 1994). Le premier implique la phagocytose des extrémités dendritiques par les kératinocytes. Le second met en jeu le transfert physique des mélanosomes via un pore de communication intercellulaire. Le troisième implique l'exocytose des mélanines par le mélanocyte suivie de l'endocytose par les kératinocytes.

L'exocytose est le mécanisme le plus classique et séduisant pour le transfert du mélanosome. En effet, les mélanosomes sont apparentés aux lysosomes de sécrétion des cellules hématopoïétiques (Stinchcombe et Griffiths, 1999). Comme les lysosomes de sécrétion subissent une exocytose régulée après stimulation, il est tentant d'émettre l'hypothèse que le transfert du mélanosome suivrait des mécanismes similaires. Ce modèle serait aussi cohérent avec les longues demi-vies observées pour les protéines membranaires

intégrales du mélanosome de stade IV (Kobayashi *et al.*, 1998; Halaban *et al.*, 2001). Un mécanisme d'exocytose, suivi d'endocytose, permettrait le recyclage de ces protéines dans des mélanosomes nouvellement formés, alors que les autres modèles requièrent un turn-over continu de ces protéines, puisque la membrane du mélanosome est transmise au kératinocyte (Marks et Seabra, 2001).

Quelque soit le mécanisme de transfert, l'interruption de ce processus est vouée à avoir des conséquences sur la pigmentation. Des preuves expérimentales impliquent le récepteur des kératinocytes *PAR2* dans le transfert des mélanosomes chez l'Homme (Seiberg *et al.*, 2000b, 2000a). Aucun effet sur la pigmentation de souris mutantes *Par2* n'a été décrit (Lindner *et al.*, 2000). Cette contradiction s'expliquerait par les différences fondamentales existant entre les systèmes pigmentaires humain et murin. En effet, les mélanocytes humains sont localisés à la jonction dermo-épidermique alors que chez la souris ils sont principalement dans les follicules pileux du compartiment dermique.

La présence de Rab3a et de SNARE sur les mélanosomes, d'une part, et de complexes de SNARE dans la membrane mélanocytaire, d'autre part, suggère que ces protéines jouent un rôle dans l'adressage des mélanosomes à la membrane plasmique, dans le transfert des mélanosomes aux kératinocytes, ou dans les deux (Scott et Zhao, 2001).

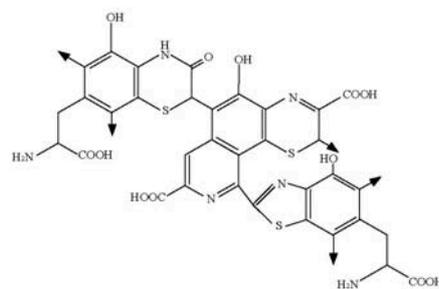
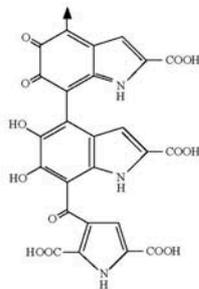
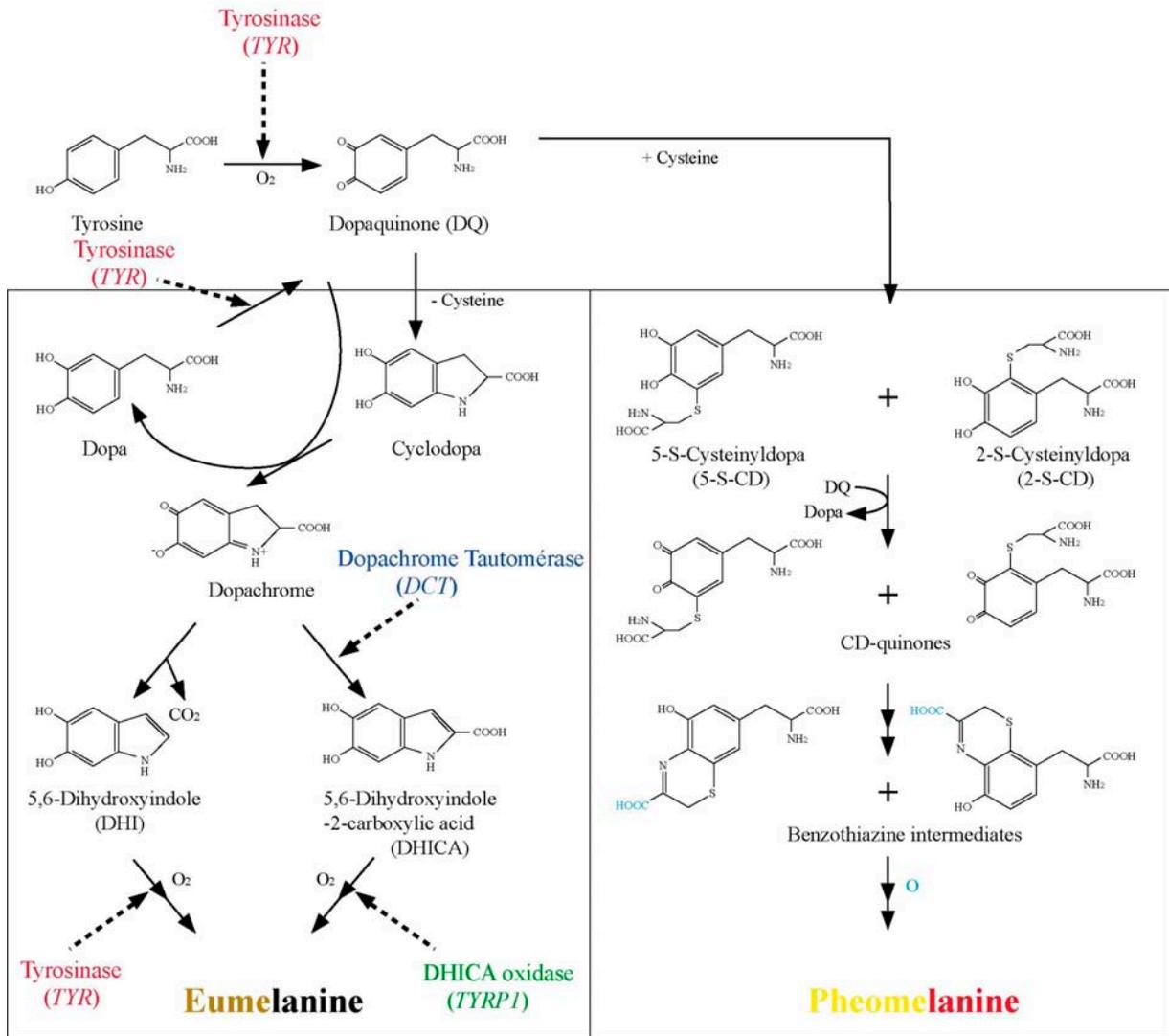


Figure 7 : Voie de synthèse des mélanines.

D. La mélanogénèse

1) Les mélanines

(a) Voie de synthèse des mélanines

Les pigments mélaniques sont des polymères de poids moléculaire indéfini mais ils dérivent tous de l'oxydation enzymatique de l'acide aminé tyrosine qui produit généralement deux types de mélanines. Des avancées majeures dans la compréhension de la chimie et de l'enzymologie de la voie de biosynthèse impliquées dans la synthèse de l'eumélanine (pigment marron/noir) et de la pheomélanine (pigment jaune/rouge) ont été réalisées (Prota, 1992; Nordlund *et al.*, 1998). L'enzyme tyrosinase catalyse les deux premières étapes, l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) et l'oxydation de DOPA (intermédiaire non libre) en DOPAquinone (Figure 7). La tyrosinase est ainsi l'enzyme clé de la mélanogénèse. Elle intervient également dans l'oxydation du 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole-5,6-quinone. L'isomérisation du DOPACHROME (indolène-2-carboxylic acid-5,6-quinone) en 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) est catalysée par la DOPACHROME tautomérase (DCT codée par le gène *Dct*) et l'oxydation du DHICA est réalisée par l'enzyme DHICA-oxydase (TYRP1 codée par le gène *Tyrp1*). Jusqu'à présent, aucune autre enzyme impliquée dans la voie de synthèse n'a pu être mise en évidence. Les autres étapes sont donc considérées comme spontanées. Notamment, la transformation de DOPAquinone en 5-S et 2-S-cysteinylDOPA est spontanée en présence de dérivés soufrés comme la cystéine. Les eumélanines dérivent des métabolites du DOPACHROME, alors que les pheomélanines découlent des métabolites des cysteinylDOPA.

La structure des polymères eu- et pheomélaniques est incertaine (Riley, 1997, 2003). En dépit de cette incertitude, les pigments mélaniques sont certainement un mélange complexe des deux types de mélanine liés à un substrat protéique (Riley, 2003).

(b) Rôle des pigments mélaniques

Le fort degré de conjugaison à l'intérieur du polymère permet le mouvement d'électrons entre les résidus quinone et catechol. Ainsi, le pigment peut agir aisément comme un piège à radicaux libres. Les charges résiduelles des groupes hydroxyles et des fonctions carboxyles permettent à la mélanine d'agir comme une trappe à cation et donc de fixer et d'excréter des cations toxiques comme les métaux lourds (Riley, 1997) ou de servir de voie d'excrétion transcutanée des métaux (Borovansky, 1994).

La combinaison de fonctions carbonyles et le haut degré de conjugaison de ses constituants fait de la mélanine un puissant absorbeur de radiations grâce à un spectre d'absorption photonique quasi continu allant de l'ultraviolet à l'infrarouge. Ainsi, les mélanines permettent la photoprotection en dissipant l'énergie photonique (thermorégulation chez les reptiles) et la chemoprotection en piégeant les radicaux libres produits par la photo-oxydation. Ainsi, la fixation des radicaux libres jouerait un rôle génoprotecteur.

De plus, il existe des preuves que la mélanine peut agir comme un atténuateur d'autres énergies comme le son (Riley, 2003).

D'autres propriétés des mélanines, comme la rigidification mécanique obtenue par liaison avec des protéines, sont d'une grande importance chez des organismes comme les arthropodes et les crustacés (Land *et al.*, 2003). La mélanisation des haricots chez les plantes et de la cuticule chez les insectes procure une rigidité supplémentaire, de même que le brunissement des fruits (la banane par exemple) en réponse à une agression de surface.

La génération d'orthoquinones pourrait avoir eu une importance évolutive de par leur réactivité, spécialement autour des groupes nucléophiles comme les thiols (-SH) et les groupements amines (-NH₂). On pense notamment à des propriétés antibiotiques comme par exemple le système immunitaire et les sprays défensifs des insectes ou l'encre des céphalopodes (Riley, 1997).

La pigmentation du pelage et plus généralement de surface est aussi largement répandue comme moyen de camouflage et d'attraction sexuelle.

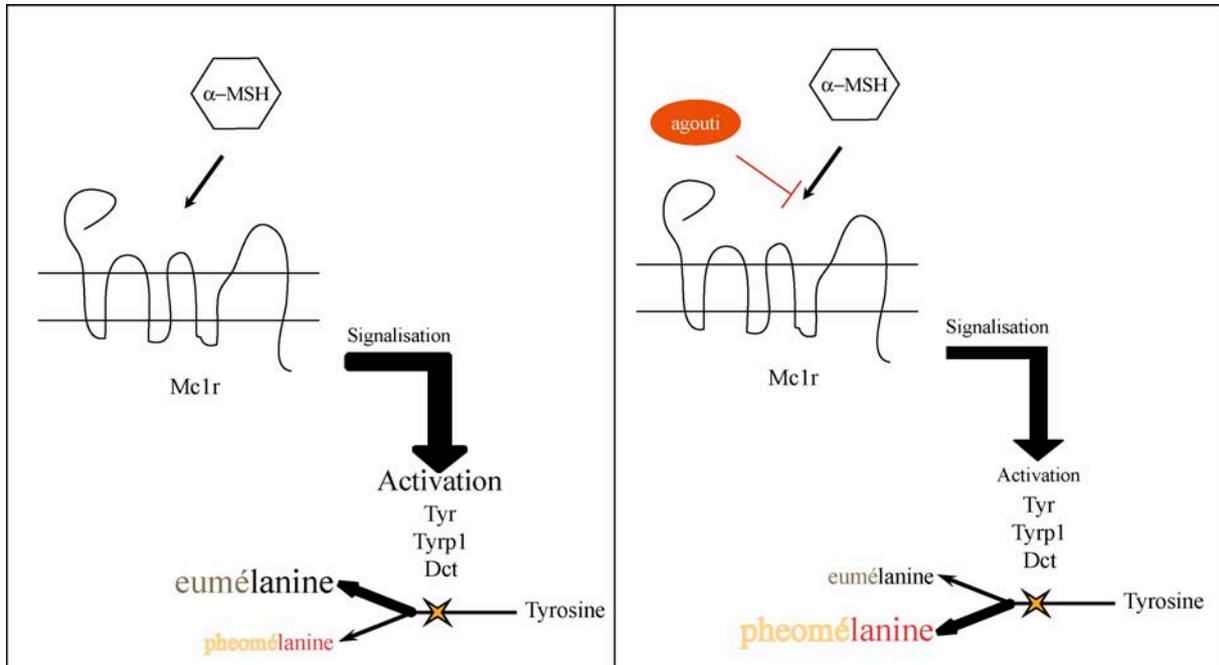


Figure 8 : Rôle de Mc1r dans la pigmentation.



Figure 9 : Photo de poils Agouti de renard (d'après (Bologna et Orlow, 2003b)).

2) Régulation du système pigmentaire

(a) Rôle du récepteur MC1R

Le récepteur Mc1r (melanocortin-1 receptor) est un récepteur à sept domaines transmembranaires faisant partie de la famille des récepteurs couplés à des protéines G (Chhajlani et Wikberg, 1992; Mountjoy *et al.*, 1992). Présent dans la membrane du mélanocyte, on le considère généralement comme la tour de contrôle de la mélanogénèse car il est au sommet d'une voie de signalisation aboutissant à l'activation de la tyrosinase et donc à la synthèse de pigments. Il est sous la dépendance d'un agoniste, l'hormone α -MSH, et d'un antagoniste, la protéine Agouti. La liaison d' α -MSH avec Mc1r provoque la synthèse préférentielle d'eumélanine alors que la fixation d'Agouti est responsable de la synthèse préférentielle de pigments pheomélaniques (Figure 8).

(b) Switch eumélanine/pheomélanine

Le cas le plus connu de régulation est le switch qui consiste à passer d'une phase de synthèse préférentielle d'eumélanine à une phase de synthèse à dominante pheomélanique. Ce changement temporaire de type de pigment est observé dans le phénotype murin sauvage appelé agouti. Il se caractérise par la présence sur un poil noir (eumélanique) d'une bande sub-apicale jaune (pheomélanique) (Figure 9).

Ce phénomène est dû à l'expression transitoire de la protéine Agouti, conditionnant ainsi une période de pheomélanogénèse (Abdel-Malek *et al.*, 2001). De nombreuses observations ont été faites sur les conditions de cette synthèse de pigments pheomélaniques. L'activité et l'expression de la tyrosinase apparaissent ainsi inférieures à celles observées pendant l'eumélanogénèse (Barber *et al.*, 1985; Burchill et Thody, 1986; Lamoreux *et al.*, 1986; Movaghar et Hunt, 1987; Tamate *et al.*, 1989; Granholm *et al.*, 1990; Kappenman *et al.*, 1992). En plus de la tyrosinase, les thiols sont essentiels dans la capture du Dopaquinone fabriqué enzymatiquement par la tyrosinase pour produire les cysteinyl Dopas nécessaires à la pheomélanogénèse (Ito, 1993). Dans des cellules en culture, une carence en cystéine accroît l'activité tyrosinase et la formation d'eumélanine (del Marmol *et al.*, 1996; Benathan, 1997) alors que la supplémentation en cystéine produit l'effet inverse, augmentation de l'activité tyrosinase et formation de pheomélanine (Smit *et al.*, 1997). Bien que le mécanisme de ces effets soit incomplètement compris, un grand nombre de preuves suggère que les atomes de

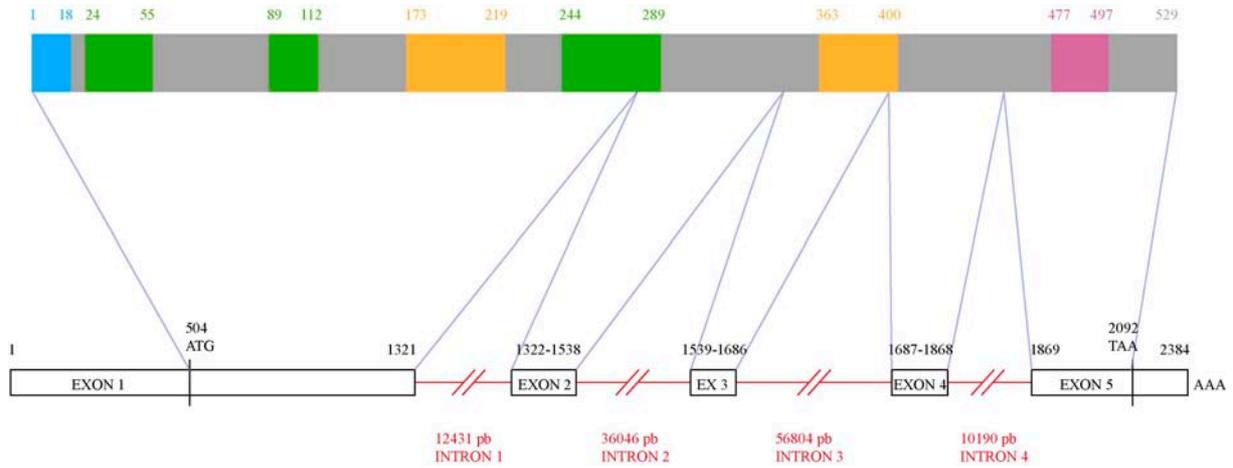


Figure 10 : Structure du gène *TYR* humain.

Bleu : peptide signal ; vert : clusters de cystéines ; orange : sites catalytiques ; mauve : domaine transmembranaire.

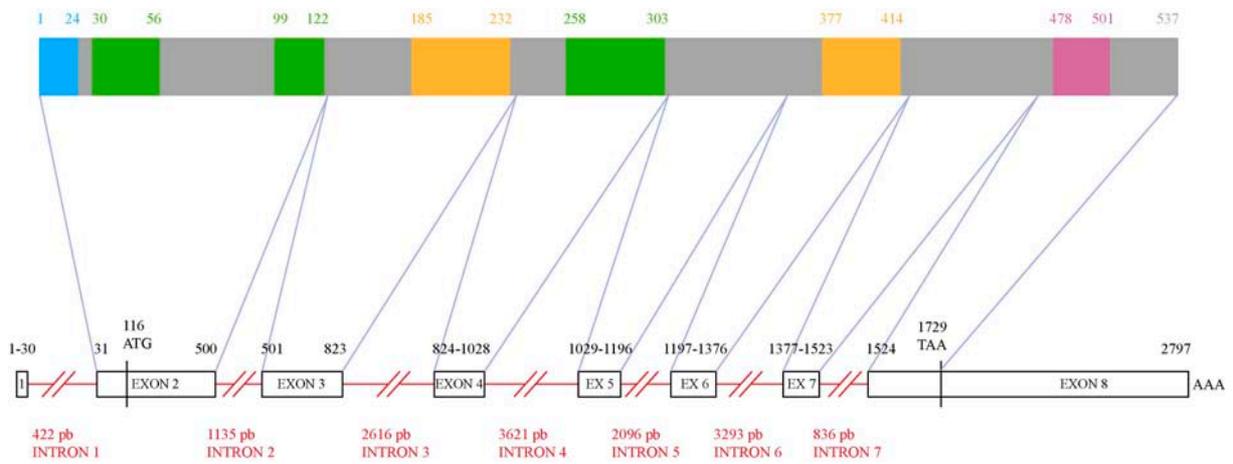


Figure 11 : Structure du gène *TYRP1* humain.

Bleu : peptide signal ; vert : clusters de cystéines ; orange : sites catalytiques ; mauve : domaine transmembranaire.

civre du site actif de la tyrosinase pourraient être réduits par les thiols, conduisant à l'inhibition de l'enzyme (Reish *et al.*, 1995). *Tyrp1*, *Dct* et *Pmel17/Silver* ne semblent pas essentiels à la phéomélanogénèse car leur expression est indétectable chez des souris *lethal yellow* (A^y) (Kobayashi *et al.*, 1995). La sous-expression de ces gènes semble être un facteur important à l'établissement de la phéomélanogénèse. En effet, la baisse d'activité de la tyrosinase observée chez les mutants murins *chinchilla* ou *himalayan* ne semble pas suffisante à elle seule pour promouvoir la synthèse de pigments jaunes.

II. LA FAMILLE TYROSINASE

A. Origine et structure des gènes

L'étude de la structure génomique des gènes *TYR* (Giebel *et al.*, 1991a; Ponnazhagan *et al.*, 1994), *TYRP1* (Box *et al.*, 1998) et *DCT* (Sturm *et al.*, 1995) humains montre que l'enzyme TYR est codée par 5 exons (Figure 10), *TYRP1* par 7 des 8 exons du gène (Figure 11) et *DCT* par les 8 exons (Figure 12). L'analyse des régions exoniques et de la phase des jonctions exon/intron (Figure 13) ne révèle qu'un site identique chez les trois gènes, celui-ci concernant le dernier exon contenant la région transmembranaire C-terminale (Sturm *et al.*, 1995).

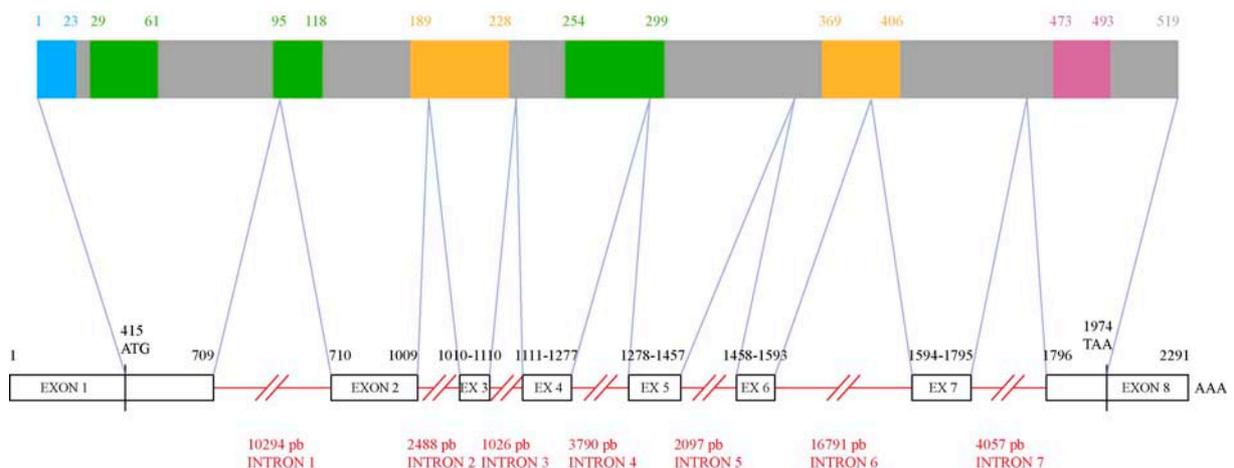


Figure 12 : Structure du gène *DCT* humain.

Bleu : peptide signal ; vert : clusters de cystéines ; orange : sites catalytiques ; mauve : domaine transmembranaire.

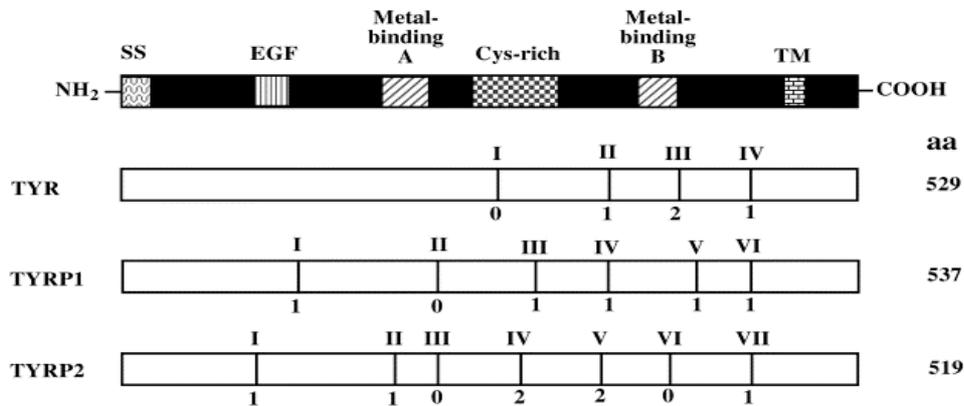


Figure 13 : Comparaison des structures exon-intron des gènes de la famille tyrosinase (d'après (Sturm *et al.*, 2001)).

En haut, illustration schématique de la structure générique des membres de la famille tyrosinase montrant la position du peptide signal (SS), de la région Epidermal Growth factor-like (EGF), des deux domaines catalytiques (Metal-binding A et B), de la région riche en cystéines (Cys-rich) et du domaine transmembranaire (TM). En dessous figurent des représentations des protéines TYR, TYRP1 et TYRP2 (DCT) avec les exons symbolisés par des boîtes. La numérotation des introns dans la partie codante est indiquée en chiffre romain au-dessus des jonctions, et la phase des introns en-dessous. Les interruptions de phases sont notées 0 – entre deux codons, 1 – entre le premier et le second nucléotide du codon, 2 – entre le deuxième et le troisième nucléotide du codon.

Chaque paire de gènes *TYR/TYRP1* et *TYRP1/DCT* partage une autre jonction commune. Ces résultats indiquent clairement que la famille des gènes *TYR* a évolué à partir d'un ancêtre commun par duplication et divergence subséquente. Avec l'analyse des similitudes de séquences et les études de génomique comparée (Budd et Jackson, 1995), on peut émettre l'hypothèse que *TYR* a donné naissance à *TYRP1*, qui a été ensuite dupliqué pour donner naissance à *DCT* (Sturm *et al.*, 1995). Ces événements apparaissent au moins antérieurs à l'évolution des mammifères étant donné l'existence de gènes *TYRP*-like chez les oiseaux, les poissons et l'axolotl (*Ambystoma Mexicanum*). Cependant, seul un *TYRP1*-like est présent chez les ascidies, ce qui suggère que la triplication de la famille tyrosinase a eu lieu pendant le début de la radiation des chordés (Sato *et al.*, 1999). Etant donné l'âge de cette duplication génique, il n'est pas étonnant qu'il n'y ait pas de gènes paralogues flanquant les loci *TYRP* quand on observe les séquences génomiques humaines. Les séquences génomiques humaines disponibles depuis peu de temps ont permis de révéler que ces gènes s'étendent sur

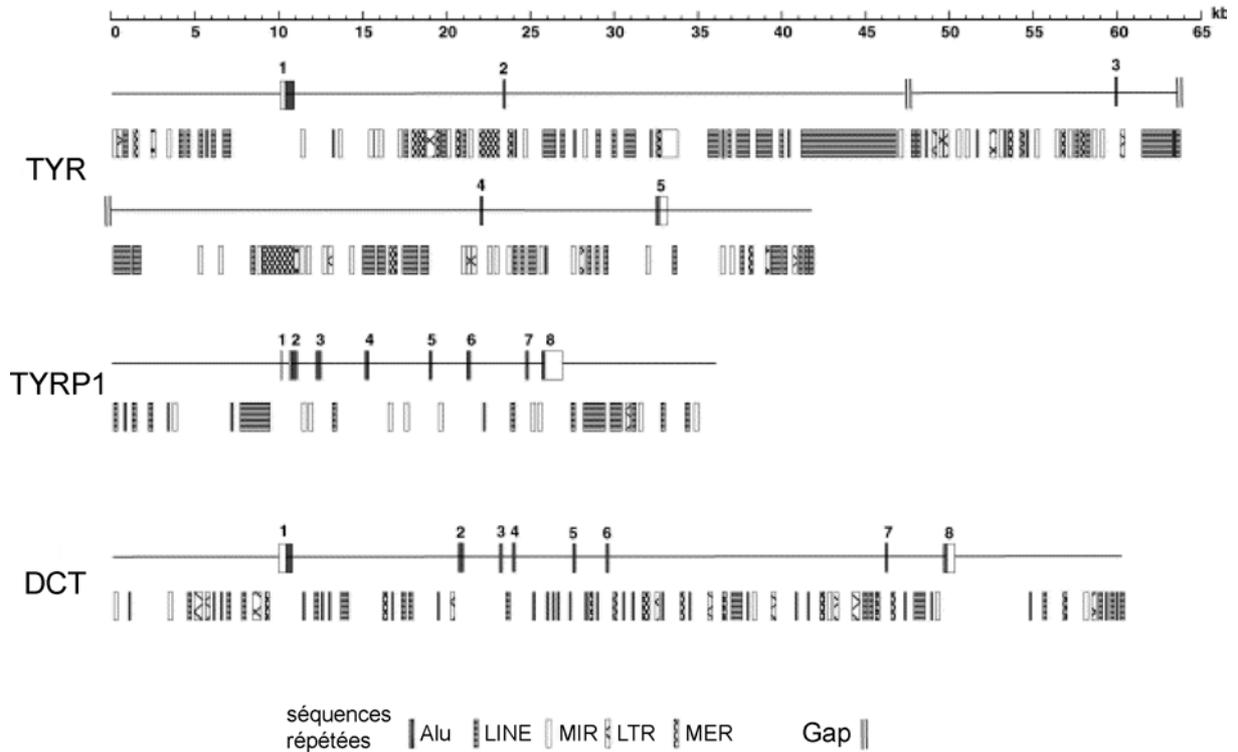


Figure 14 : Présence de séquences répétées dans les gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* humains (d'après (Sturm *et al.*, 2001)).

L'organisation génomique de chaque locus est schématisée avec les positions relatives des exons et des séquences répétées. Les régions non-codantes des exons sont indiquées par des boîtes vides, les régions codantes par des boîtes pleines.

des loci très vastes comparativement à la taille des séquences codantes. Ainsi, le locus *TYR* englobe une région de 105 Kb (taille provisoire), alors que les gènes *TYRP1* et *DCT* comportent respectivement 37 et 60 Kb. La distribution d'éléments répétés à l'intérieur de ces loci supporte l'idée que le volume du génome humain dérive de l'accumulation et de la dégénérescence d'éléments transposables (Smit, 1999) (Figure 14).

De nombreux transcrits alternatifs de *Tyr* ont été décrits (Terao *et al.*, 1989; Porter et Mintz, 1991; Kelsall *et al.*, 1997) (Figure 16) ainsi que trois types de transcrits du gène *DCT* (Pisarra *et al.*, 2000) (Figure 15).

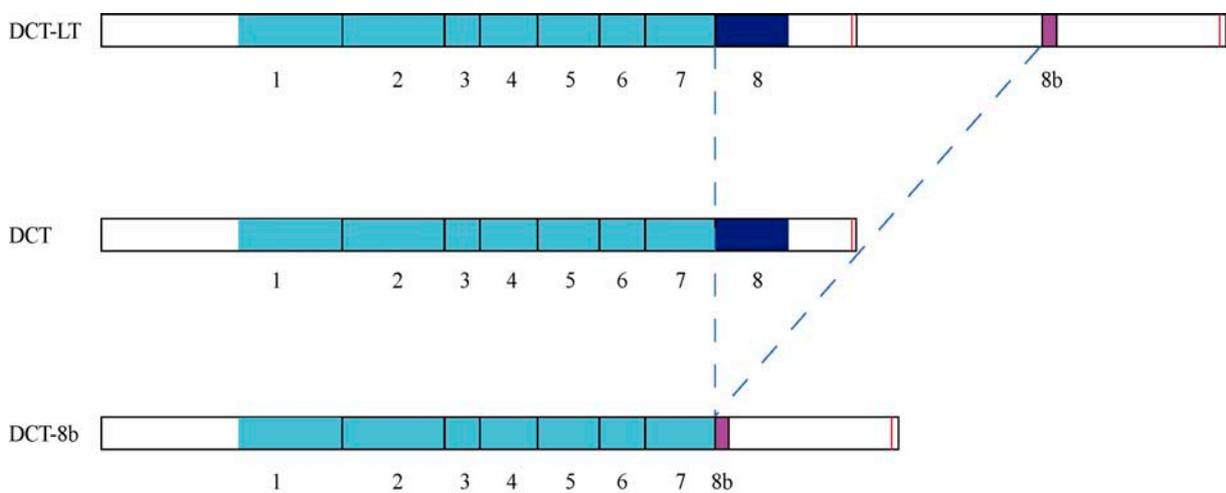


Figure 15 : Structure des transcrits alternatifs du gène *DCT* (d'après (Pisarra *et al.*, 2000)).

Bleu clair : exons ; bleu foncé : exon 8 alternatif ; mauve : exon 8b alternatif ; blanc : régions non-codantes ; rouge : signal de polyadénylation.

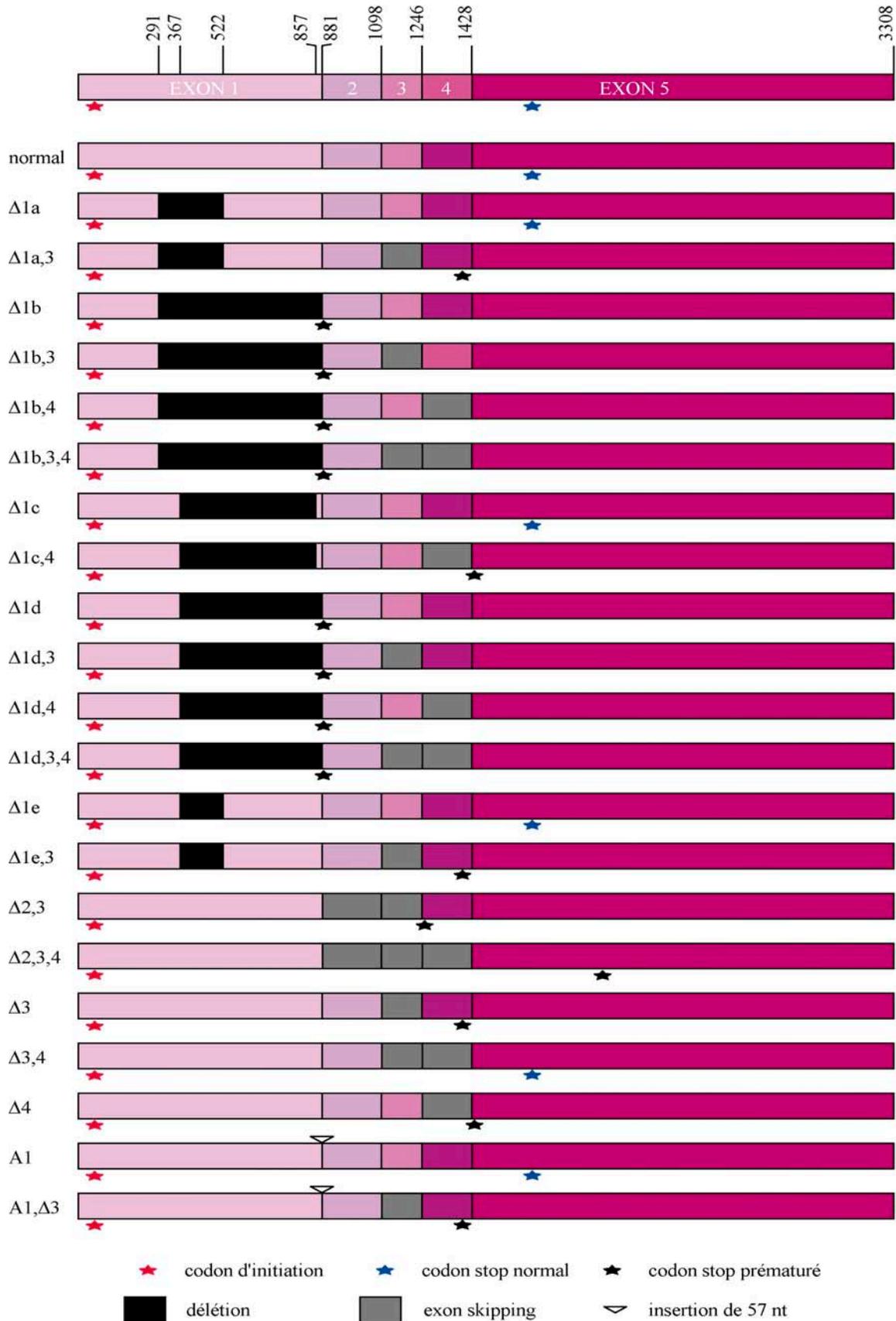


Figure 16 : Structure des transcrits alternatifs du gène *Tyr* murins (d'après (Kelsall *et al.*, 1997)).

B. Régions promotrices

Les régions promotrices des gènes de la famille tyrosinase possèdent en commun une M-box de 11 pb (AGTCATGTGCT), contenant le motif central CATGTG qui est le consensus de fixation de nombreux facteurs de transcription à structure Hélice-Boucle-Hélice.

La région 5' de *TYR* contient un fragment de 270 pb suffisant pour diriger une expression maximale tissu-spécifique (Kluppel *et al.*, 1991; Beermann *et al.*, 1992). Ce fragment contient plusieurs M-box (avec un cœur CANNTG) incluant un TDE (Tyrosinase distal element), une M-box de 11 pb et une E-box initiatrice (Inr-E) (Shibata *et al.*, 1992; Yasumoto *et al.*, 1994; Yasumoto *et al.*, 1997). Pour *TYRPI*, un fragment de 215 pb contenant seulement une M-box est suffisant pour produire une expression maximale (Shibata *et al.*, 1992). Le promoteur de *DCT* contient aussi une M-box et un élément CRE-like (cAMP Response Element) (Bertolotto *et al.*, 1998b). Un élément DDE-1 (DOPAchrome tautomerase distal enhancer 1) localisé de -447 à -416 serait également impliqué dans l'expression spécifique dans le mélanocyte (Amae *et al.*, 2000).

La régulation du promoteur du gène *TYR* passe aussi par des éléments distaux très éloignés du promoteur classique. Ainsi, un élément fonctionnel a été découvert dans la région de -8 à -10 kpb chez l'Homme (Regales *et al.*, 2003). Cette région est homologue au LCR (Locus Control Region) situé à -15 kpb chez la souris (Giraldo *et al.*, 2003). D'ailleurs, le phénotype hypopigmenté *chinchilla-mottled* s'explique par des réarrangements de cette région, soulignant l'importance de ces sites pour l'expression correcte du gène *TYR* (Porter *et al.*, 1991; Oetting, 2000).

C. Structure des enzymes

1) Peptide signal

La famille tyrosinase de mammifères est synthétisée avec un peptide signal N-terminal qui cible le polypeptide naissant au RE pour son repliement, sa maturation et son adressage (Helenius *et al.*, 1992). Le peptide signal (en bleu sur Figure 10, Figure 11 et Figure 12) doit être clivé pour permettre un repliement correct car son hydrophobicité restreint sévèrement la mobilité N-terminale durant ce processus. Il est généralement admis que pour Tyr, le clivage intervient entre 18G et 19H.

2) Cystéines et ponts disulfures

Dix-sept résidus cystéine, répartis en 3 clusters (en vert sur Figure 10, Figure 11 et Figure 12), sont observés chez les tyrosinases de mammifères. Quinze d'entre eux sont parfaitement conservés chez les TYRPs. Deux clusters sont localisés en N-terminal du premier site catalytique et le troisième se trouve entre les deux sites catalytiques.

Le premier cluster contient 4 à 5 Cys et est caractérisé par des paires CC consécutives. Le second cluster contient 5 Cys et a été appelé région EGF-like car les trois premières Cys correspondent parfaitement à un motif EGF-like (motif n° PS00022 dans la banque Prosite accessible à <http://au.expasy.org/prosite/>), et une autre portion comprenant deux Cys correspond parfaitement à l'autre motif EGF-like (motif n° PS01186). La majeure partie de ce cluster, comprenant les 4 dernières Cys, correspond aussi à un motif EGF-related, le motif laminin-LE (motif n° PS01248). Il est caractérisé par la présence d'éléments CxC et CxxC. Le troisième cluster contient aussi de 4 à 5 Cys mais n'a aucune homologie avec les motifs EGF-like, bien qu'il comporte un élément CxxC.

Le rôle des 3 clusters riches en Cys est à l'heure actuelle majoritairement inconnu. Mais il est clair que le premier cluster jouerait un rôle dans le repliement correct et le maintien du domaine N-terminal, si l'on en croit les données cristallographiques obtenues chez les catechol oxydases de plante (Klabunde *et al.*, 1998). En ce qui concerne le second cluster, les régions EGF-like sont impliquées dans les interactions protéine-protéine (Davis, 1990). Des interactions entre TYR et les TYRPs ont été mises en évidence (Orlow *et al.*, 1994; Jimenez-Cervantes *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1998; Manga *et al.*, 2000), mais l'implication du motif laminin-LE n'a jamais été prouvé. De plus, la contribution du domaine C-terminal dans l'interaction TYR-TYRPs est aussi possible car la délétion *platinum* affecte dramatiquement l'interaction de TYR avec les TYRPs (Manga *et al.*, 2000). Des ponts disulfures pourraient aussi médier cette interaction car d'une part, un résidu Cys est présent en C-terminal de TYR et TYRP1, mais pas de DCT, et d'autre part, l'interaction TYR-TYRP1 est plus forte que l'interaction de l'une et l'autre avec DCT (Orlow *et al.*, 1994). Le troisième cluster de Cys est, comme le second, uniquement présent chez les tyrosinases de mammifères. Son importance dans la fonction de TYR est soulignée par le grand nombre de mutations de cette région qui provoquent l'albinisme (Albinism Database accessible à

<http://albinismdb.med.umn.edu/>). Une fonction possible pourrait être dans l'interaction avec les chaperonnes.

La localisation des ponts disulfures dans la famille tyrosinase de mammifère est totalement inconnue. Cependant, les trois clusters formeraient principalement des ponts internes. Le premier cluster porterait, d'après les données obtenues chez les catechol oxydase de plante, deux ponts disulfures internes. Conformément aux informations relatives aux motifs LE-like, le second cluster formerait deux ponts disulfures internes aux positions C91-C100 et C103-C112 pour les tyrosinases humaines et murines. Les quatre premières Cys du troisième cluster sont parfaitement conservées. Cela suggère qu'elles pourraient former deux ponts disulfures. En revanche, le groupe thiol de la cinquième Cys resterait libre, quand il existe. Des réductions/isomérisations/reformations de ponts disulfures dans les clusters lors du repliement des molécules néosynthétisées sont probables. Presque toutes les cystéines semblent essentielles pour un repliement correct. Toutes les mutations connues touchant des cystéines provoquent l'inactivité de la protéine. Les mutations humaines C36Y, C55Y, C89R et C289G/R causent l'albinisme. C103S est la mutation murine albino la plus classique. L'apparition d'une cystéine surnuméraire provoque aussi un mauvais repliement, comme l'atteste les cas d'albinisme humain associés aux mutations R77C et W272C. Des conséquences identiques pour Tyrp1 apparaissent consécutivement aux mutations murines *light* (R38C) ou *brown* (C110Y).

Le motif CxxC mérite des commentaires particuliers. Il est conservé chez TYR et Tyr à deux positions : 100-103 (CGNC) dans le second cluster et 244-247 (CDIC) dans le troisième. Ce motif est reconnu dans le RE par les enzymes impliquées dans la réduction/isomérisation/formation des ponts disulfures, comme ERp57, une sous-unité de la calnexine impliquée dans le réarrangement des ponts disulfures des glycoprotéines pendant leur maturation réticulienne (Frand *et al.*, 2000; High *et al.*, 2000). L'interaction de Tyr et du complexe calnexine-ERp57 ayant été détectée (Harrison *et al.*, 2000; Rosenzweig et O'Halloran, 2000), il est possible que ce motif joue un rôle dans la maturation de cette enzyme.

3) N-glycosylation

Les rôles des N-glycannes dans l'adressage, la stabilité et l'activité des enzymes de la famille tyrosinase de mammifères ont été largement étudiés. Comme le motif LE-like et le

troisième cluster de cystéines, les sequons de N-glycosylation sont uniquement présents chez les tyrosinases d'animaux. Les N-glycannes ajoutés dans le RE aux tyrosinases animales jouent un rôle important dans la voie de sécrétion de ces enzymes. Sans addition de N-glycannes, la tyrosinase murine est incapable de se replier correctement (Branza-Nichita *et al.*, 2000) car ils facilitent la liaison avec les lectines-chaperonnes. De plus, la glycosylation différente pendant le transit Golgien pourrait contribuer aux différences de transport des tyrosinase-like au prémélanosome. La région 457-468 précèdent le fragment transmembranaire pourrait être importante. Cette région est plus courte chez les TYRPs que chez TYR, et la distance plus courte au domaine transmembranaire pourrait empêcher la glycosylation du dernier sequon (Molinari et Helenius, 2000), localisé au site CuB et affectant certainement le plus l'activité de ces enzymes. Au contraire, la proximité de sequons avec le N-terminal favorise la glycosylation (Nilsson et von Heijne, 2000). Ainsi, des différences subtiles entre TYR et les TYRPs pourraient jouer sur leur degré de glycosylation, et ainsi contrôler leur adressage et transport au mélanosome à différents stades de maturation (Raposo *et al.*, 2001).

Les α -glucosidases ont un rôle critique dans la maturation de la tyrosinase (Petrescu *et al.*, 2000) et l'association/dissociation correcte avec la calnexine est essentielle pour favoriser le repliement et l'acquisition du cuivre (Branza-Nichita *et al.*, 1999).

La glycosylation de deux sites est suffisante pour avoir une interaction avec la calnexine et la maturation d'une tyrosinase active, cependant, la glycosylation de N86 et N371 est indispensable pour obtenir une activité tyrosinase totale. La tyrosinase murine est glycosylée sur 4 des 6 sequons potentiels, N111 et N161 n'étant pas occupés (Branza-Nichita *et al.*, 2000). La tyrosinase humaine est glycosylée sur ses 7 sequons (Ujvari *et al.*, 2001). L'efficacité de la glycosylation accroît pour des taux de traduction moins élevés, et l'occupation du site N290 est inhibée quand la traduction est rapide. En outre, Tyr contiendrait deux types de sites accepteurs : des sites de glycosylation rapide, co-traductionnelle, et des sites de glycosylation lente, dépendant de la conformation tridimensionnelle (Olivares *et al.*, 2003).

Tyr et Tyrp1 murines présentent un mélange de N-glycannes fortement mannosylés et de N-glycannes complexes sialylés mais Tyr présente une glycoforme uniquement fortement mannosylée absente chez Tyrp1 (Branza-Nichita *et al.*, 1999; Petrescu *et al.*, 2000).

L'étude de la maturation de plusieurs mutants TYR a montré que l'albinisme oculocutané de type 1 (OCA1) est une maladie associée à la rétention de TYR dans le RE (Halaban *et al.*, 2000; Toyofuku *et al.*, 2001). Généralement, la plupart de ces formes mutantes est incorrectement repliée et retenue jusqu'à dégradation dans le RE par association prolongée avec la calnexine et la calreticuline. Cependant, certaines mutations non-critiques, comme R402Q, permettent une maturation à une température permissive de 32°C (Berson *et al.*, 2000), expliquant ainsi la pigmentation résiduelle trouvée dans ces cas.

4) Domaine transmembranaire

Toutes les tyrosinases de mammifères possèdent un domaine transmembranaire (en rose sur Figure 10, Figure 11 et Figure 12) suivi d'un court peptide C-terminal. L'absence de domaine transmembranaire chez *Streptomyces* suggère que ce domaine est apparu plus tard dans l'évolution des tyrosinases, probablement quand l'enzyme s'est insérée dans une membrane (membrane du thylakoïde dans les chloroplastes chez les plantes et mélanosomes dans les mélanocytes chez les animaux). Le fragment transmembranaire ancre TYR et les TYRPs, avec le cœur de la protéine dans la lumière mélanosomale et la queue C-terminal orientée dans le cytosol.

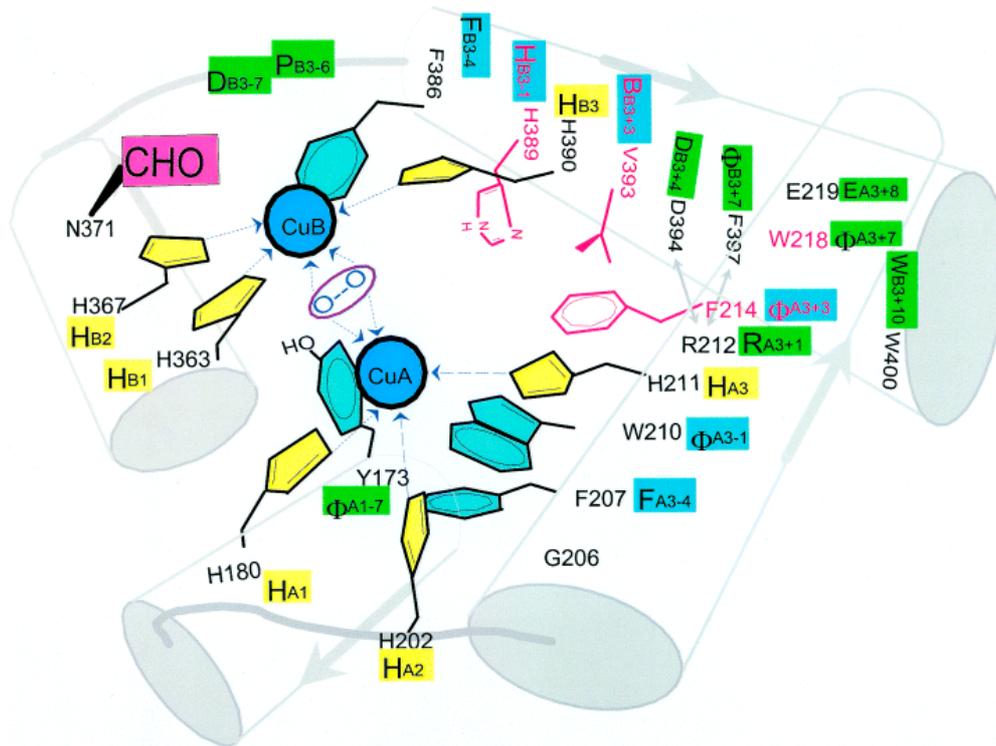


Figure 17 : Modèle du site actif des tyrosinases de mammifères.

En jaune, les résidus histidine directement liés au cuivre ; en bleu, noyaux aromatiques structurants ; en rose, déterminants possibles des variations d'affinité différentes des TYR et TYRPs ; en vert, autres résidus conservés contribuant à la structure protéique. La position du N-glycane localisé au site CuB est indiqué par CHO (d'après (Garcia-Borron et Solano, 2002)).

5) Sites catalytiques et activité catalytique

La comparaison des séquences peptidiques des tyrosinases de mammifères avec celles des hémocyanines (protéines de transport de l'oxygène contenant du cuivre) d'arthropodes et de mollusques a permis d'identifier deux régions d'homologies apparentes nommées CuA et CuB (Lerch, 1988) (Tableau 2).

CuA
$\Phi X_6 \mathbf{H} X_n \mathbf{H} X_4 \mathbf{F} X_2 \underline{\mathbf{H}} \underline{\mathbf{R}} X \underline{\Phi} L X_2 \underline{\Phi} \underline{\mathbf{E}} X_n B P \underline{\Phi} \Phi [D/N] \Phi$
CuB
$\mathbf{H} X_3 \mathbf{H} X_n \underline{\mathbf{D}} P B \mathbf{F} X_2 \underline{\mathbf{H}} \underline{\mathbf{H}} X_2 \underline{\mathbf{B}} \underline{\mathbf{D}} X B \underline{\Phi} X_2 \underline{\mathbf{W}} X_n G \underline{\mathbf{Y}} X \underline{\mathbf{Y}}$

Tableau 2 : Résidus conservés définissant les sites catalytiques des enzymes de la famille tyrosinase.

En gras : les 6 His directement liées au Cu (en jaune sur la Figure 17). **Souligné** : résidus formant le cœur aromatique (en bleu sur la Figure 17 ; Φ pour un résidu aromatique, F, Y ou W et l'hydrophobe $\underline{\mathbf{B}}$, V pour TYR). Les résidus en italique signifie qu'ils changent entre TYR et les TYRPs, ils pourraient ainsi être impliqués dans le changement d'affinité pour les o-diphenols (TYR) aux indoles (TYRPs). Double souligné : résidus conservés importants pour le maintien de la structure tridimensionnelle de TYR et TYRPs (en vert sur la Figure 17). La plupart d'entre eux est essentielle pour la stabilité de la structure en 4 hélices autour du centre dicuivre ($\underline{\mathbf{R}}$ dans CuA avec $\underline{\mathbf{D}}$ et $\underline{\Phi}$ dans CuB). D'autres résidus localisés loin du site catalytique pourraient aussi être importants pour le maintien de la structure globulaire, par exemple P $\underline{\Phi}$ Φ [D/N] Φ entre les deux sites cuivre et le motif G $\underline{\mathbf{Y}}$ X $\underline{\mathbf{Y}}$ avec le domaine transmembranaire (d'après (Garcia-Borrón et Solano, 2002)).

Ces deux régions constituent les sites catalytiques (en orange sur Figure 10, Figure 11 et Figure 12). Des données cristallographiques des catechol oxydases (Klabunde *et al.*, 1998) et des prédictions de structures secondaires indiquent que le cœur actif de la tyrosinase est un arrangement délimité par un groupe de quatre hélices localisées dans une poche hydrophobe située près de la surface (Garcia-Borrón et Solano, 2002) (Figure 17). Les trois histidines contenues dans chaque site sont parfaitement conservées ainsi que l'ensemble de ces motifs. Ces His permettent de coordonner un cation divalent. Pour TYR (EC 1.14.18.1), il s'agit d'un atome de cuivre (Lerner *et al.*, 1950), alors que pour DCT (EC 5.3.3.12) il s'agirait d'un atome de zinc (Solano *et al.*, 1996). La nature de l'atome porté par TYRP1 n'est pas encore clairement défini (Furumura *et al.*, 1998). Le mécanisme de transfert de l'atome métallique aux tyrosinase-like est encore moins connu. Outre l'implication de la protéine Menkes (Mnk, ATP7A) dans le transfert du cuivre à la tyrosinase humaine (Petris *et al.*, 2000), le rôle des motifs CxxC trouvés dans les différents clusters de cystéines est également envisagé, par

analogie avec le modèle d'interaction bien connu de la yCCS (yeast Chaperone for superoxide dismutase, SOD) avec la SOD. De plus, la nature différente de l'atome lié aux différents membres de la famille tyrosinase suggère que les mécanismes d'acquisition de ces atomes seraient eux aussi différents.

DCT possède une activité DOPAchrome tautomérase (Yokoyama *et al.*, 1994). L'activité catalytique de TYRP1 est encore controversée. Dans des cellules pigmentaires murines, il a été rapporté que Tyrp1 manifeste une activité catalase (Halaban et Moellmann, 1990), DOPA oxydase (Jimenez-Cervantes *et al.*, 1993), DOPAchrome tautomérase (Winder *et al.*, 1994b), tyrosine hydroxylase (Zhao *et al.*, 1994) et une activité DHICA oxydase (Kobayashi *et al.*, 1994). Cependant, le rôle chez l'Homme est moins clair. Contrairement aux cellules murines, TYRP1 ne présente pas d'activité DHICA oxydase dans les cellules pigmentaires humaines (Boissy *et al.*, 1998). Réciproquement, la tyrosinase humaine, au contraire de la tyrosinase murine, posséderait une activité DHICA oxydase (Olivares *et al.*, 2001). Ainsi, malgré les différences d'activité catalytique entre l'Homme et la souris, les fonctions catalytiques nécessaires sont assurées, quoi que par des enzymes différentes.

La plupart des éléments formant le cœur actif de ces enzymes est conservée entre les représentants de la famille chez les mammifères. Cependant, les enzymes DCT humaines et murines, et au moins Tyrp1, se lient à des substrats indoliques mais montrent une affinité pour les phénols moins grande que les tyrosinases (Garcia-Borron et Solano, 2002). Ce switch dans la spécificité de substrat a certainement pour origine des différences subtiles dans les sites catalytiques respectifs. Bien que les histidines liant un atome de cuivre soient invariantes entre TYR et TYRPs, quatre changements principaux parmi les résidus hydrophobes « conservés » pourraient être responsables de ces changements d'affinité de phénol à indole. Pour les enzymes TYR humaines et murines, les positions de ces changements sont F214 (H227 et H224 respectivement pour Tyrp1 et Dct), W218 (L231 et L228 respectivement pour Tyrp1 et Dct), H389 (L403 et L396 respectivement pour Tyrp1 et Dct) et V393 (T407 et T400 respectivement pour Tyrp1 et Dct) (Figure 17).

Le changement H389L est probablement le plus important. En effet, la plupart des tyrosinases procaryotes et toutes les tyrosinases eucaryotes contiennent une paire HH à la fin de leur site CuB mais pas Tyrp1 ni Dct qui contiennent LH. Ainsi, les différences d'activités catalytiques entre TYR et les TYRPs seraient liées à la troisième His-binding. Chez Tyr, H389 et H390 sont impliquées respectivement dans l'ancrage du substrat au site actif et dans

la liaison du cuivre (Olivares *et al.*, 2002). H389 interagit avec le groupement carboxyle des chaînes latérales des *o*-diphénols et ce résidu est responsable de la stéréospécificité de Tyr pour la L-DOPA (Tripathi *et al.*, 1988). Le remplacement de cette His par une Leu pourrait être responsable de la très faible affinité des Tyrps pour l'*o*-diphénol, mais le mutant Tyr H389L manifeste encore une activité résiduelle *o*-diphénol oxydase (Jimenez-Cervantes *et al.*, 1994; Olivares *et al.*, 2002).

Pour le changement V393T, Val et Thr ont une chaîne latérale isostérique, mais Val est hydrophobe et Thr possède un groupe hydroxyle capable de former une liaison hydrogène avec le substrat, potentiellement l'azote indolique des substrats des TYRPs.

Le changement F214H dans CuA peut être comparé à H389L dans CuB. Globalement, TYR et TYRPs possèdent le même nombre d'histidines au site actif, les 6 histidines bien connues pour la liaison du cuivre et une septième dont la position change entre TYR et TYRPs. Ainsi, TYRPs possèdent leur septième His dans CuA, à l'emplacement correspondant à F214 pour TYR. La famille tyrosinase comporte toujours un résidu hydrophobe (Leu, Phe) et un résidu hydrophile (la 7^{ème} His), mais les deux sont permutés entre TYR et TYRPs. Cela pourrait être crucial pour ancrer une chaîne latérale mobile (L-tyrosine, L-Dopa et autres phénols pour TYR) ou un anneau indolique fixe (DHICA, L-Dopachrome pour TYRPs).

L'effet du changement W218L dans la spécificité du substrat pourrait être moindre car W218 n'est pas totalement conservé chez toutes les tyrosinases. Cependant, il est localisé dans une région très importante, les mutations au résidu voisin 217 réduisant dramatiquement l'activité tyrosinase. En parallèle de la paire de changements proposés à CuB, l'orientation de cette position est similaire à F214H, mais dans l'hélice suivante. Ainsi, l'interaction aromatique pour une bonne orientation du substrat favorisant la catalyse serait possible.

D. Régulation des enzymes

1) Régulation transcriptionnelle

L'expression des enzymes de la mélanogénèse, qui est restreinte aux mélanocytes et aux cellules pigmentaires rétinienne, semble être contrôlée par un réseau complexe de facteurs de transcription qui régulent positivement et négativement la transcription des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*. Le facteur de transcription le plus important dans la régulation de TYR et TYRP1 semble être MITF (microphthalmia-associated transcription factor). MITF est un

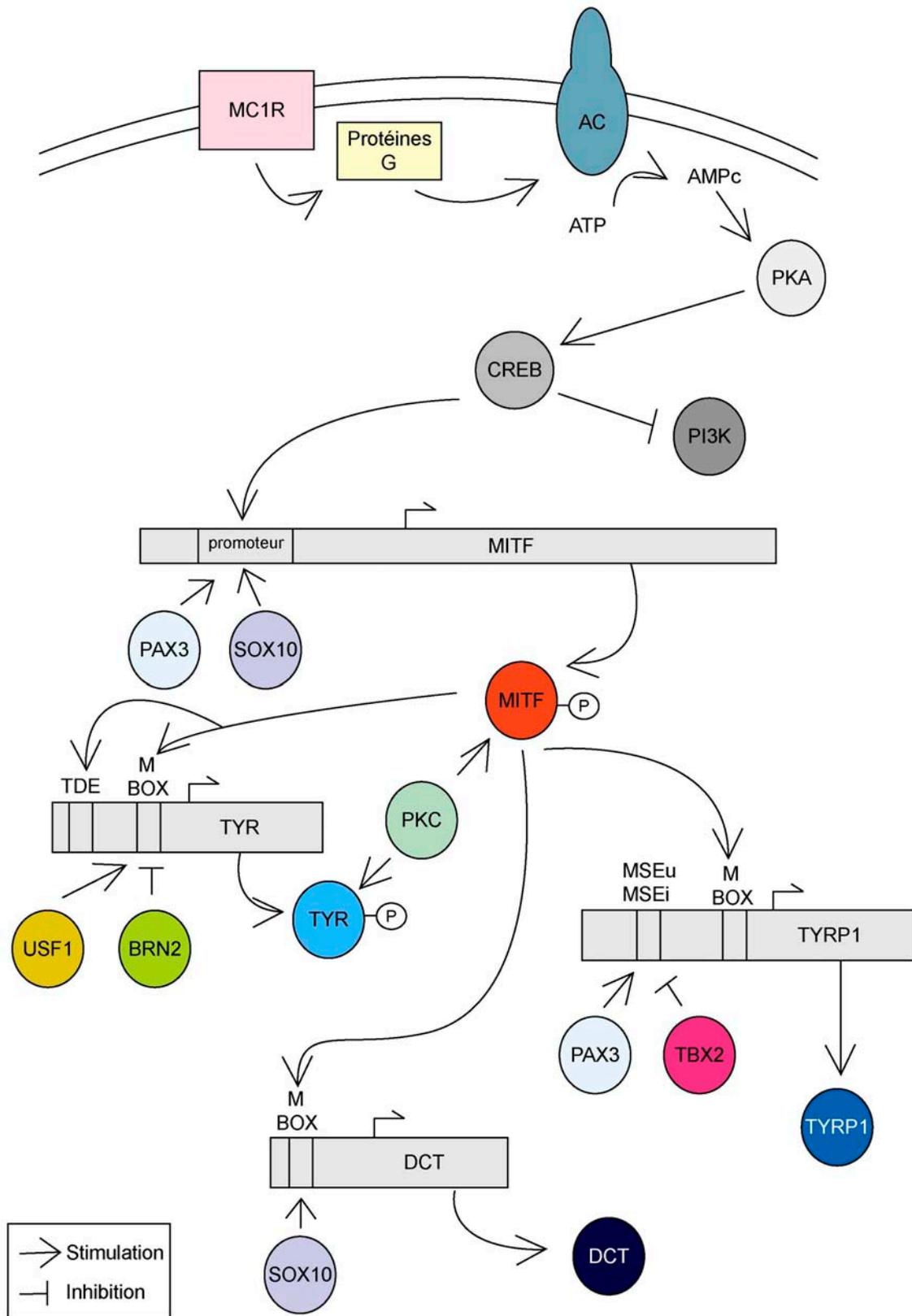


Figure 18 : Schéma de la régulation transcriptionnelle des gènes de la famille tyrosinase.

facteur de transcription basique Hélice-Boucle-Hélice avec une leucine zipper qui joue un rôle central dans le développement du lignage mélanocytaire (Hodgkinson *et al.*, 1993; Tachibana, 2000). En effet, les mutations murines dans le gène *Mitf* conduisent à des phénotypes hypopigmentés sévères à cause d'une absence de mélanocytes (Steingrimsdóttir *et al.*, 1994). Cependant, plusieurs études montrent que MITF est requis mais pas suffisant pour induire l'expression de *TYR* et *TYRP1* (Bertolotto *et al.*, 1998a; Gaggioli *et al.*, 2003). Cette limitation de l'effet de MITF pourrait provenir de la localisation de *TYR* et *TYRP1* dans une région chromatiniennne transcriptionnellement inactive nécessitant l'acétylation et/ou la phosphorylation des histones (Gaggioli *et al.*, 2003). L'activation de MITF serait aussi régulée par phosphorylation par la PKC (Protéine Kinase C) (Mahalingam *et al.*, 1997).

La liaison de l' α -MSH sur MC1R provoque l'activation d'une adénylate cyclase, l'élévation de la concentration intracellulaire en AMPc et l'activation de la PKA (Protéine Kinase A) (Figure 18). La voie AMPc/PKA, via la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein), stimule l'activité du promoteur *Mitf*, conduisant à la stimulation de l'expression de *Mitf*. *Mitf* se fixe alors sur le TDE et/ou les M-box présentes dans les régions promotrices des gènes *Tyr* et sur les M-box de *Tyrop1* (Aksan et Goding, 1998; Goding, 2000). L'activation de la cascade PKA/CREB par l'AMPc s'accompagne de façon concomitante d'une inhibition de la PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) (Khaled *et al.*, 2003).

En plus de MITF, plusieurs autres facteurs de transcription ont été impliqués dans la régulation des gènes mélanogéniques. SOX10 (SRY-box containing gene 10), un facteur de transcription apparenté à SRY (sex-determining) peut stimuler l'activité du promoteur de *DCT* (Potterf *et al.*, 2001). La transcription de *Tyrop1* semble stimulée par PAX3 (Paired box gene 3), un facteur de transcription à homéodomaines (Galibert *et al.*, 1999), et inhibée par TBX2 (T box transcription factor 2), un facteur de transcription brachyury-related (Carreira *et al.*, 1998). La régulation par ces deux facteurs passe par leur fixation sur deux éléments de régulation négative appelés MSEu et MSEi (melanocyte-specific elements upstream et initiator) (Carreira *et al.*, 1998; Galibert *et al.*, 1999).

L'activité du promoteur de *TYR* est quant à elle stimulée par USF1 (UV-activated upstream stimulatory factor 1) (Galibert *et al.*, 2001) qui est également un facteur de transcription Hélice-Boucle-Hélice à leucine zipper. Elle est inhibée par BRN2 (POU3F2), une protéine à domaine POU de classe III (Eisen *et al.*, 1995). PAX3 et SOX10 jouent aussi

un rôle central dans l'émergence du lignage mélanocytaire car ces facteurs stimulent l'activité du promoteur MITF (Watanabe *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Verastegui *et al.*, 2000; Potterf *et al.*, 2001) et des mutations dans *PAX3* et *SOX10* ont été détectées dans les syndromes de Waardenburg de type III et IV qui conduisent aussi à des défauts pigmentaires (Hoth *et al.*, 1993; Pingault *et al.*, 1998). A ce jour, aucune mutation dans *USF1*, *BRN2* et *TBX2* n'a été détectée dans des désordres pigmentaires humains ou murins. Ainsi, la pertinence physiologique de ces gènes dans la régulation de la pigmentation reste à clarifier.

Sachant que *TYR* et *TYRP1* possèdent un élément activateur commun et partagent un facteur de transcription, il est raisonnable de penser que ces gènes sont corégulés (Shibata *et al.*, 1992). Cependant, on sait maintenant que *TYRP1* peut être régulé indépendamment (Sturm *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1995; Vijayasradhi *et al.*, 1995a; Fang et Setaluri, 1999; Fang *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2002). *TYRP1* est fréquemment réprimé au niveau transcriptionnel (Vijayasradhi *et al.*, 1995a; Fang et Setaluri, 1999; Vachtenheim *et al.*, 2001) alors que *TYR* est plutôt régulé au niveau post-transcriptionnel (Halaban *et al.*, 1997; Halaban *et al.*, 2000). L'intervention d'un répresseur empêchant la liaison de MITF à la M-box de *TYRP1* a été suggéré pour expliquer la répression sélective de ce gène dans les mélanomes (Fang *et al.*, 2002). De même, MITF semble insuffisant pour diriger l'expression spécifique de *DCT* dans les mélanocytes (Yasumoto *et al.*, 1997).

Les mécanismes de régulation sont certainement très sophistiqués. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le transcrit *Tyr* pourrait inhiber sa propre transcription, générant ainsi une boucle de régulation en retour (Takeuchi *et al.*, 2000). Ils ont mis en évidence d'une part, une séquence (GA)_n localisée entre -662 et -546 de la région amont 5' du gène *Tyr*, et d'autre part, un motif (TC)₁₀ situé 100 bases en aval du site de polyadénylation. Ces deux éléments, avec la séquence (UC)₁₀ contenue dans le 3' non codant de l'ARN, formeraient une structure en triplex, empêchant ainsi la fixation de facteur de régulation sur les éléments en cis du 5' amont du gène *Tyr*.

2) Maturation / calnexine

Localisée premièrement dans le RE, la calnexine a également été trouvée associée à la membrane du mélanosome, indiquant son implication dans la biogénèse de ce dernier (Dakour *et al.*, 1993; Toyofuku *et al.*, 1999). Protéine membranaire de type I, la calnexine fonctionne comme une chaperonne moléculaire qui s'associe spécifiquement avec les glycoprotéines

incomplètement repliées et facilite l'acquisition d'une structure tridimensionnelle correcte. Le repliement correct de la tyrosinase est obtenu par interaction directe avec la calnexine pendant un temps précis lors de leur maturation dans le RE. Une fonction similaire de chaperonne de la calnexine est également suspectée vis-à-vis de TYRP1 (Kato *et al.*, 1998). L'interaction de la calnexine et de la calrériculine, un inhibiteur d' α -glucosidases, est aussi requise pour l'acquisition d'une structure acido-résistante (Kato *et al.*, 1998). Les tyrosinases incorrectes semblent être dégradées dans le RE grâce à l'action de la calnexine (Halaban *et al.*, 1997).

Aussi bien dans les mélanocytes normaux que dans les mélanomes, alors que les polypeptides TYRP1 néosynthétisés mûrent rapidement et sortent du RE, une certaine proportion de polypeptides tyrosinase est retenue dans le RE pour une période plus longue et est dégradée (Halaban *et al.*, 1983; Jimenez *et al.*, 1988; Halaban *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1998). Cette dégradation requiert l'ubiquitination de la tyrosinase et l'activité protéolytique du protéasome cytosolique (Halaban *et al.*, 1997). Les signaux qui prédisposent la tyrosinase, mais pas TYRP1, à cette dégradation cytosolique ne sont pas encore identifiés. Des différences dans les chaînes sucrées N-liées entre TYR et TYRP1 pourraient influencer les cinétiques d'association et de dissociation avec les chaperonnes du RE. Ainsi, l'impossibilité d'une rapide dissociation avec les chaperonnes du RE marquerait les tyrosinases néosynthétisés pour une « rétrotranslocation » dans le cytosol et leur dégradation par les protéasomes.

De plus, la présence dans la queue cytoplasmique de signaux positifs d'export du RE pourrait faciliter leur transit vers l'appareil de Golgi. Ainsi, les enzymes TYRP1 dépourvues de queue cytoplasmique sont retenues dans le RE et rapidement dégradées (Xu *et al.*, 1998). Le taux d'export de TYR et TYRP1 apparaît alors comme étant déterminé par des mécanismes d'adressage qui reconnaissent les cinétiques de repliement dans la lumière du RE et des motifs de transit dans la queue cytoplasmique (Halaban *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998).

TYRP1 transite dans le Golgi rapidement ($t_{1/2}$ de 30-45 min) alors que TYR est maturée plus lentement ($t_{1/2}$ de 3-4 heures) (Halaban *et al.*, 1983; Jimenez *et al.*, 1988; Vijayasradhi *et al.*, 1991). Le taux de maturation dans le Golgi reflète généralement la vitesse avec laquelle les protéines sont exportées du Golgi (Barriocanal *et al.*, 1986). Il est possible que le transit ralenti de TYR dans le Golgi, comme sa rétention et sa dégradation dans le RE, pourrait aussi réguler la quantité de TYR mature délivrée au mélanosome.

3) Glycosylation.

La nature des modifications des sucres N-liés de TYR et TYRP1 subies dans le Golgi a été largement étudiée (Halaban *et al.*, 1983; Roux et Lloyd, 1986; Jimenez *et al.*, 1988; Vijayasradhi *et al.*, 1991). Les modifications de TYR et TYRP1 dans le Golgi sont qualitativement et quantitativement différentes. Alors que des sucres N-liés complexes et hybrides sont greffés sur TYR et TYRP1, des sucres O-liés sont trouvés uniquement sur TYR (Halaban *et al.*, 1983; Roux et Lloyd, 1986; Vijayasradhi *et al.*, 1991; Negroiu *et al.*, 1999b). La fonction de ces sucres O-liés n'a pas été étudiée.

Chez la souris, la maturation de Tyr inclut la N-glycosylation d'au moins quatre des six sites de glycosylation disponibles (Branza-Nichita *et al.*, 2000). La TYR humaine qui possède sept sites potentiels de glycosylation porte six ou sept glycannes, selon le taux de traduction (Ujvari *et al.*, 2001).

Tyrp1, chez l'Homme et la souris, est synthétisée comme un précurseur de 55-69 kDa dans le RE. Après repliement, la maturation golgienne produit une glycoprotéine de 75 kDa (Vijayasradhi *et al.*, 1991; Negroiu *et al.*, 1999a).

4) Adressage/transport au mélanosome

Le transport vésiculaire intracytoplasmique et le trafic membranaire au mélanosome est maintenant bien caractérisé (Jimbow *et al.*, 2000). Une fois le processus de glycosylation des protéines de la famille tyrosinase terminé dans le complexe golgien, elles doivent être prises en charge par des vésicules intracellulaires pour leur transport du TGN (Trans-Golgi Network) au mélanosome (Figure 19). Pendant la formation des vésicules de transport, des protéines d'enveloppe (coat proteins) s'assemblent sur la face cytoplasmique des membranes bourgeonnantes et recrutent des protéines cargos via des interactions directes ou indirectes avec les protéines à transporter (Wirtz, 1991; Odorizzi *et al.*, 1998). L'enveloppe des membranes sert d'outil mécanique pour la libération du bourgeon vésiculaire du TGN (Rothman et Wieland, 1996). Les vésicules ainsi formées perdent ensuite leur enveloppe pour fusionner avec les membranes de l'accepteur. Au niveau du TGN, la tyrosinase (ainsi que TYRP1) est enfermée dans des vésicules enveloppées (Jimbow *et al.*, 1971). TYRP1 est ensuite localisée dans de petites vésicules non enveloppées aggrégées à l'extérieur ou à l'intérieur de la membrane externe des mélanosomes ellipsoïdaux de stade II (Der *et al.*,

1993). Ces vésicules non enveloppées (50 nm de diamètre) dériveraient des vésicules enveloppées qui auraient perdu leur manteau après la libération de TYRP1 dans le mélanosome.

De nombreuses données ont été accumulées sur les motifs d'adressage permettant aux protéines membranaires de trouver leur cible. De nombreuses preuves expérimentales montrent que le peptide C-terminal contient des signaux essentiels pour la sortie du Golgi et l'adressage au mélanosome. Par exemple, une tyrosinase tronquée dépourvue des 27 derniers acides aminés (mutation *platinum*, C^p) conduit à une sévère hypopigmentation par déroutage de l'enzyme à la surface cellulaire (Beermann *et al.*, 1995).

En utilisant des protéines chimères, Vijayasaradhi et ses collaborateurs ont identifié un motif di-leucine impliqué dans le transport de TYRP1 au mélanosome (Vijayasaradhi *et al.*, 1995b). Des déterminants d'adressage de la tyrosinase ont également été identifiés (Calvo *et al.*, 1999). Tyrosinase et Tyrp1 humaines et murines possèdent un motif di-leucine commun

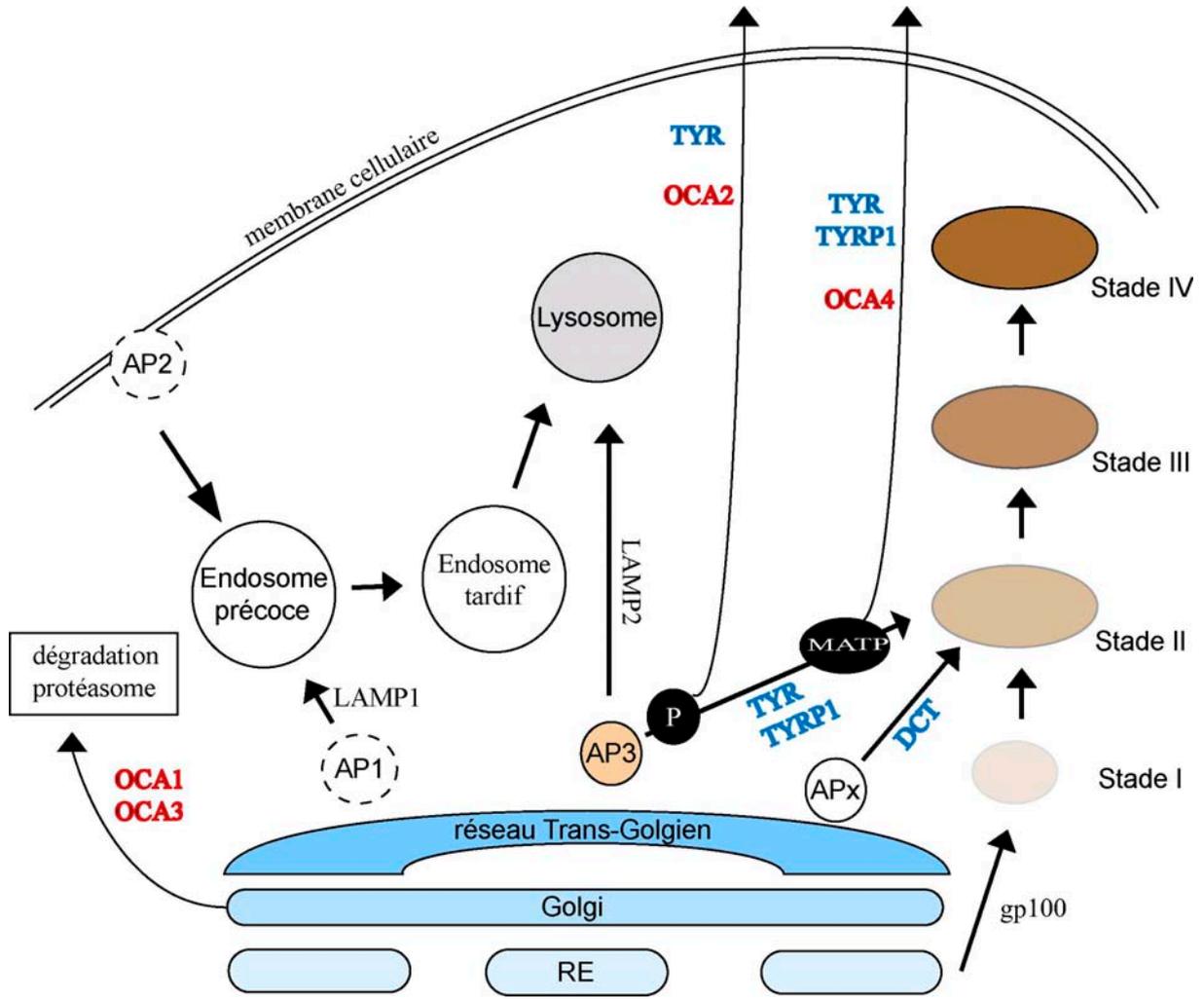


Figure 19 : Schéma du transport des protéines mélanosomales (d'après (Kushimoto *et al.*, 2003)).

dans leur queue cytoplasmique. Un motif similaire, SPLL, est d'ailleurs rencontré dans Pmel17 (gp100), une protéine structurale du mélanosome. Il a été montré que des complexes de protéines adaptatrices (AP) se liait à la queue cytoplasmique des tyrosinases associées au mélanosome via un motif EEXXXLL (Honing *et al.*, 1998). Ce motif interagit peu avec les complexes AP-1 et AP-2. En fait, seul le complexe AP-3 est important pour le transport intracellulaire des protéines de la famille tyrosinase du TGN au mélanosome (Figure 19). De plus, AP-3 ne reconnaît pas les queues cytoplasmiques d'autres protéines non mélanosomales contenant des motifs di-leucine et/ou « tyrosine-based ».

Des études détaillées sur TYRP1 ont montré qu'un segment de six acides aminés contenant un motif di-leucine dans la queue cytoplasmique était nécessaire dans l'adressage de TYRP1 pour la rétention intracellulaire et le transport aux endosomes (Vijayasradhi *et al.*, 1995b; Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998). Le motif di-leucine ainsi que le résidu acide glutamique situé 3 à 4 résidus en amont du motif sont conservés non seulement entre les protéines mélanosomales de type I mais aussi avec une protéine mélanosomale de type III, pink-eyed dilution. Cette protéine à douze domaines transmembranaires possède un motif di-leucine amino-terminal (NTPLLR) exposé dans le cytoplasme (Rinchik *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1997). Cependant, sachant que cette protéine est visiblement non glycosylée (Rosemblat *et al.*, 1994), les modes de transport RE-Golgi et post-golgien via le motif di-leucine nécessitent d'être formellement vérifiés.

Le rôle fonctionnel *in vivo* de la queue cytoplasmique et du motif di-leucine est confirmé par deux observations. Premièrement, la mutation non-sens de l'allèle *platinum* de la tyrosinase murine, qui produit une protéine tronquée dépourvue de motif di-leucine, résulte en un ciblage impropre de la Tyrosinase et l'apparition d'un phénotype albino (Chintamaneni *et al.*, 1991; Beermann *et al.*, 1995). Deuxièmement, des mutations dans les sous-unités δ -3A et β 3A de l'Adaptator Protein Complex 3 (AP-3), qui se lie au motif di-leucine, produisent respectivement les phénotypes mutants *mocha* et *pearl* et apparaissent liées à l'hypopigmentation dans un certain nombre d'individus atteints du syndrome d'Hermansky-Pudlak-like (Feng *et al.*, 1997; Kantheti *et al.*, 1998; Dell'Angelica *et al.*, 1999; Spritz, 2000). De plus, dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak et ses modèles murins, les défauts dans le fonctionnement du mélanosome s'accompagnent d'altérations des lysosomes et des plaquettes (Odorizzi *et al.*, 1998; Stinchcombe et Griffiths, 1999).

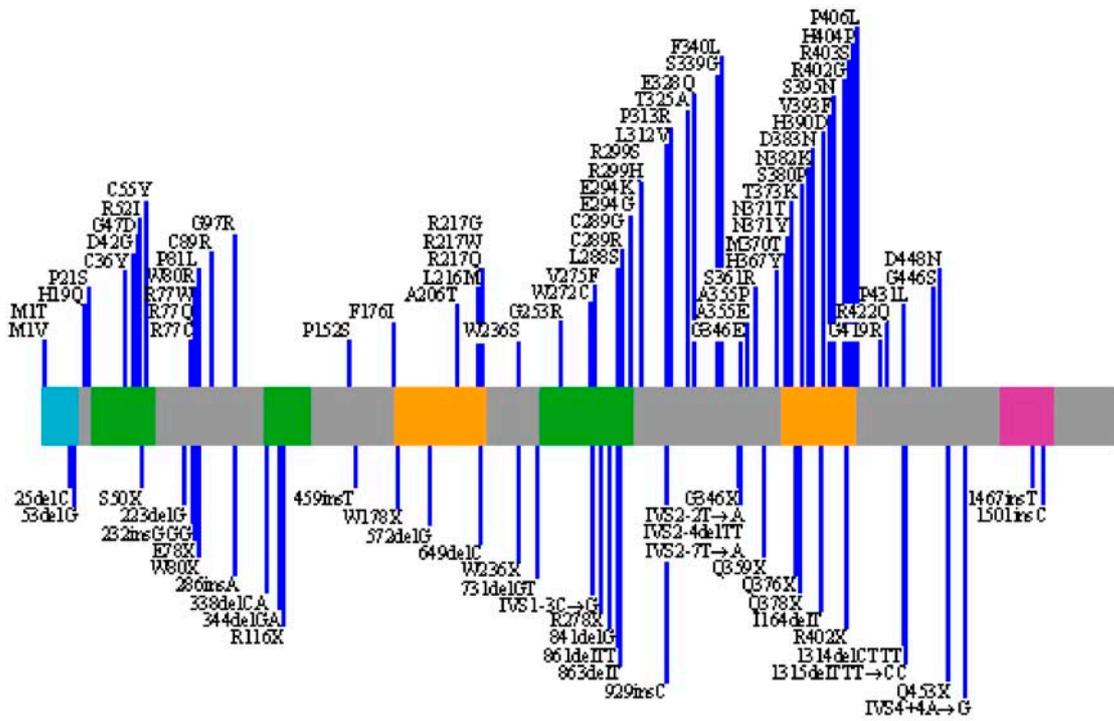
Bien qu'il y ait plusieurs résidus tyrosine en C-terminal du motif di-leucine dans la queue cytoplasmique de TYR et TYRP1 qui pourraient servir de motif tyr-based, le motif di-leucine est nécessaire et suffisant pour le trafic intracellulaire. Ainsi, le mutant TYRP1 délété de la partie C-terminale, dépourvu de tous les résidus (incluant plusieurs résidus tyr potentiels) en aval du motif di-leucine, est correctement adressé (Vijayasradhi *et al.*, 1995b). Cependant, les signaux tyr-based, spécifiquement Y-X-X-Ø, où Ø est un acide aminé hydrophobe, pourraient jouer conjointement un rôle avec le motif di-leucine dans l'adressage des protéines mélanosomales. Un tel motif est présent chez TYR mais aussi chez TYRP1 et DCT (Simmen *et al.*, 1999). Cela souligne la possibilité que les protéines mélanosomales utilisent des voies alternatives pour rejoindre le mélanosome grâce à ces motifs « tyr-based ». Par exemple, les acides aminés C-terminaux (QSVV) de Tyrp1 néosynthétisée s'associent avec GIPC (GAIP interacting protein, C terminus), une protéine à domaine PDZ (protéines Psd-95, Dlg and ZO1) (Liu *et al.*, 2001) et la protéine RAB38 semble impliquée uniquement dans le transport de Tyrp1 (Loftus *et al.*, 2002).

D'autres signaux autres que di-leucine pourraient être présents chez certaines protéines mélanosomales. En effet, DCT et OA1 (une protéine membranaire de type III codée par le gène *ocular albinism type 1*), toutes deux localisées dans le mélanosome, sont dépourvues du traditionnel motif di-leucine précédé du résidu acide (Vijayasradhi *et al.*, 1995b; Schiaffino *et al.*, 1996). Inversement, la présence d'un motif di-leucine pourrait ne pas complètement empêcher l'adressage des protéines mélanosomales à d'autres localisations cellulaires.

5) Fonctionnement en complexe

Le processus de mélanisation impliquerait l'intégration de produits de gènes spécifiques des mélanocytes dans le mélanosome (Orlow *et al.*, 1994; Winder *et al.*, 1994a). Tyrosinase, Tyrp1 et Dct existent en tant que complexe de haut poids moléculaire grâce à une interaction relativement stable (Hearing *et al.*, 1992; Orlow *et al.*, 1994), hypothétiquement maintenue par les domaines EGF riches en cystéines et hautement conservés. Cette interaction forte maintient même Tyr et Tyrp1 ensemble sous la forme d'hétérodimère dans une solution détergente (Jimenez-Cervantes *et al.*, 1998). De plus, l'activité de la tyrosinase est plus stable en présence de Tyrp1 et de Dct (Hearing *et al.*, 1992). L'absence de Tyrp1 fonctionnelle résulte en la dégradation rapide de la tyrosinase, alors que la présence de Tyrp1 normale résulte en la stabilisation de la protéine tyrosinase (Kobayashi *et al.*, 1998). Des expériences

MUTATIONS FAUX-SENS



MUTATIONS NON-SENS, AFFECTANT LE CADRE DE LECTURE ET LES SITES D'EPISSAGE

Figure 20 : Répartition de quelques mutations dans le gène *TYR* humaine impliquées dans l'OCA1 (d'après <http://albinismdb.med.umn.edu/oca1map.htm>).

récentes de mutagenèse ont confirmé que Tyrp1 est aussi activement impliquée dans l'inactivation de l'activité catalytique de tyrosinase (Manga *et al.*, 2000).

Certains auteurs pensent que la formation du complexe TYR-TYRP1-DCT interviendrait précocement dès la maturation dans le RE (Toyofuku *et al.*, 2001).

6) Phosphorylation

La tyrosinase est aussi sujette à une régulation post-traductionnelle. La PKC- β (proteine kinase C- β) est requise pour l'activation de l'enzyme. Cette activation est médiée par la phosphorylation de deux sérines en positions 505 et 509 dans la queue C-terminale cytoplasmique de l'enzyme (Park *et al.*, 1999). De plus, cette phosphorylation induirait la formation d'un complexe entre TYR et TYRP1 (Wu et Park, 2003).

E. Les mutants de la famille tyrosinase

De nombreux mutants des gènes de la famille tyrosinase ont été décrits aussi bien chez l'Homme et la souris que chez d'autres espèces animales. Ces mutants permettent généralement d'avoir des informations sur la structure et la fonction de ces enzymes.

1) TYR

La mutation la plus connue est certainement la mutation *albino* qui caractérise les souris blanches complètement dépourvues de pigments à cause d'une tyrosinase totalement inactive (Jackson et Bennett, 1990; Yokoyama *et al.*, 1990). Ce genre de mutations est aussi bien documenté chez l'Homme avec le phénotype OCA1A (OculoCutaneous Albinism type 1 A) pour lequel une centaine de mutations a été recensée (Figure 20) (Oetting *et al.*, 1998; Oetting *et al.*, 2003) (Albinism Database accessible à <http://albinismdb.med.umn.edu/>).

D'autres mutations causent des dépigmentations moins sévères, c'est le cas chez la souris des mutants *chinchilla* qui possèdent une activité tyrosinase partielle ou chez l'Homme du phénotype OCA1B (5 à 10% de l'activité tyrosinase normale (Giebel *et al.*, 1991b)) (Oetting *et al.*, 1998) (Albinism Database accessible à <http://albinismdb.med.umn.edu/>). Chez les individus OCA1B, des pigments s'accumulent au cours de la vie.

2) TYRP1

La mutation *brown* touche aussi une cystéine et provoque l'apparition d'un phénotype marron. Alors que les mutants *cordovan* et *cordovan-Hardwell* possèdent 1% de transcrits *Tyrp1* de type sauvage avec un phénotype marron foncé, les *brown-Pasteur*, identiques aux *brown* n'ont pas d'expression détectable de ce gène (Jackson *et al.*, 1990). Chez l'Homme, TYRP1 est impliqué dans l'albinisme de type 3 (OCA3) (Albinism Database accessible à <http://albinismdb.med.umn.edu/oca3mut.html>) caractérisé par une dépigmentation partielle de la peau, des yeux et des cheveux.

3) DCT

Aucune forme d'albinisme n'a été associé à des mutations du gène *DCT* humain. En revanche, chez la souris, *Dct* est impliquée dans l'établissement du phénotype *slaty* caractérisé par une couleur de pelage légèrement diluée due à une perte d'activité partielle de l'enzyme *Dct* codée par cet allèle (Jackson *et al.*, 1992).

III. LES BOVINS

A. Généralités sur les races

La famille des bovidés est relativement grande puisqu'elle comprend des mammifères aussi variés que peuvent l'être entre eux le chamois, le yack, le bison d'Europe ou encore l'antilope royale. Mais en ce qui concerne les races bovines, l'aurochs paraît être l'unique ancêtre de toutes celles qui vivent sur notre vieux continent, et plus particulièrement des bovins dits de race française. L'aurochs, *Bos primigenius*, était un bovin de grande taille (plus de 2 m au garrot), nettement plus imposante que celle du plus grand des taureaux actuels. L'aurochs originel n'existe plus, seules les peintures trouvées sur les parois de grottes, comme celles visibles à Lascaux II, constituent nos références. On estime cependant que ses cornes puissantes dépassaient 1,20 m de long, son pelage était fauve foncé, presque noir. C'était un animal sauvage et rustique très résistant au froid et à l'humidité. Venu d'Eurasie, il s'installe en Europe à la fin du Quaternaire, juste avant la grande période de glaciation. Mentionné dans « la guerre des Gaules » de Jules César, les derniers spécimens furent chassés dans le royaume de France sous le règne de Philippe Auguste. Le dernier aurochs d'Europe fut abattu en Lituanie en 1627.

Actuellement, les bovins sont répandus sur l'ensemble du territoire français à l'exception du sud-est méditerranéen. Autrefois on distinguait trois groupes : les "laitières", les "viande et travail" et les "triple aptitude" (surtout rustiques en montagne), groupes qui ont évolué, en raison d'abord de la disparition de la traction bovine puis de la spécialisation des élevages. Aujourd'hui, on distingue les "laitières spécialisées" et les "mixtes" (viande et lait), les "viande" et les "rustiques, ces deux derniers groupes formés quasi exclusivement de vaches allaitantes. Les troupeaux ont une dimension fort modeste : en moyenne, moins de 30 vaches par élevage, et rares sont les élevages, tant laitiers qu'allaitants, dont les effectifs sont supérieurs à 100 vaches.

On dénombrait 26 races officiellement reconnues en 1998, sans compter les races à petits effectifs faisant l'objet d'un programme de conservation. Neuf races bovines françaises ont été étudiées dans le cadre de ces travaux et leurs caractéristiques sont présentées dans la partie suivante.

B. Les races étudiées

1) La Normande

La vache Normande serait la descendante de bovins amenés par les Vikings, au IX^e-X^e siècle. D'abord connue sous le nom de Cotentine, elle regroupe d'anciennes variétés locales telles que la Cauchoise, la Brayonne, l'Augeronne et la Mayennaise ; il faut attendre 1883 pour voir naître son herd-book. En 1946, la première vache inséminée artificiellement sera une Normande. Dans les années 1960, elle fut menacée par le raz de marée des Prim'Holstein (alors appelées Frisonnes pie noire) et elle paiera un lourd tribut aux quotas laitiers à partir de 1984. Après avoir été décimée par l'invasion alliée en Normandie pendant la seconde guerre mondiale, on compte aujourd'hui 1,2 millions de têtes dans 40 départements français.

La race Normande est une race mixte reconnue pour ses qualités de laitière, de fromagère et de bouchère grâce à une excellente qualité de carcasses. Sa rusticité, sa facilité de vêlage expliquent l'intérêt de nombreux pays pour cette vache remarquable au lait riche en protéines. En effet, la Normande peut passer l'année à l'extérieur dans sa région d'origine, c'est-à-dire dominée par un climat océanique tempéré. La race se plaît dans des pâturages à herbe grasse et dense. C'est la raison pour laquelle on trouve, depuis une centaine d'années, autant de vaches Normandes dans des pays d'Amérique du Sud comme la Colombie (2 millions d'individus) où le climat semi-tropical favorise une herbe abondante.

La robe est dite tricolore (Figure 21) ; elle comprend des poils marron-rouge, noirs et blancs. On parle de bringeure pour désigner le fait que des poils noirs sont plus ou moins présents sur un fond marron-rouge. Signes distinctifs : les panachures sont fauve bringé et blanc, la tête blanche avec des lunettes autour des yeux et un mufler tacheté. Cependant il existe deux types de robes, une très chargée en panachures, l'autre à dominance blanche.



Figure 21 : Vache de race Normande.

2) La Limousine

La race Limousine est une race bouchère remarquable par son rendement en viande, 75% de muscle par rapport au poids de la carcasse, tout en se contentant d'herbages de moindre qualité. Avec un taux de vêlage sans aide très élevé, cette race est surtout remarquable par la qualité du produit viande à tous les âges. Race rustique et robuste, la Limousine ne craint ni les fortes pluviométries ni les hivers longs et rigoureux du plateau de Millevaches. Ses qualités lui ont permis de s'implanter de manière très importante aux Etats-Unis avec un million de têtes.

La Limousine est un rameau du bétail blond du Sud-Ouest ; d'ailleurs, vers les années 1960, on voulut la fondre avec la Blonde d'Aquitaine, l'Agenaise et la Lourdaise, une décision heureusement contrée par les éleveurs limousins. Cette race paraît très ancienne, voire enracinée à la région car, selon Louis de Neuville, elle serait la descendante des vaches dessinées sur les parois de Lascaux. Vers les années 1850, Charles de Léobardy, éleveur dans les monts d'Ambazac, reliefs situés au nord-est de Limoges, fit beaucoup pour la sélection et l'amélioration de la race. Dès cette époque la Limousine fut très recherchée comme vache allaitante pour fournir en veaux les grandes villes du Limousin et de l'Auvergne.

Le cheptel français compte 1,5 million de têtes soit une augmentation de 50% en 15 ans. Bel avenir pour la Limousine qui s'est implantée dans 64 pays. Utilisée pure ou en croisements, elle donne naissance à la Brahmousin, vache américaine par excellence, en croisement avec le zébu Brahman.

La couleur froment (Figure 22) caractéristique avec des auréoles plus claires autour des yeux et du mufle est inscrite au herd-book créé en 1886 puis révisé en 1923 et 1937.



Figure 22 : Vache de race Limousine.

3) La Gasconne

Les vaches Gasconnes originaires du Sud-Ouest de la France sont de très bonnes allaitantes, rustiques, solides, fertiles, d'une grande longévité et qui vèlent sans problème dans des conditions naturelles difficiles.

La Gasconne est une très vieille race qui semble être installée dans sa région depuis l'Antiquité ; la race a subi des influences ibériques et asiatiques au cours de son histoire, des influences dues aux invasions des ibères et des romains. Les bêtes Gasconnes fournissaient le lait et la viande, mais aussi leur force pour le travail des champs et du bois. Une épidémie faillit la faire disparaître au XVII^e siècle. Le premier livre généalogique, créé en 1856, échoua à cause de l'existence de deux rameaux : la Gasconne à muqueuses noires et la Gasconne aréolée. Il a fallu attendre 1955 pour que les deux races fusionnent officiellement grâce au herd-book, ce qui n'empêche pas les éleveurs locaux de faire toujours la différence entre les deux.

Avec 27000 têtes françaises et une présence dans de nombreux pays européens (Angleterre, Ecosse, Italie, Hollande, Espagne, Slovaquie) mais aussi au Paraguay, la Gasconne a un bel avenir devant elle.

La robe est gris argenté ou blaireau avec des marques noires sur le bord des oreilles (Figure 23).



Figure 23 : Vache de race Gasconne.

4) La Blonde d'Aquitaine

La Blonde d'Aquitaine est une très bonne race à viande, résistante, même au climat chaud. Elle s'adapte à tous les modes d'élevage et sa polyvalence lui permet de produire aussi bien des veaux de boucherie, des jeunes sous la mère, des broutards, des génisses de boucherie, des vaches de réforme et des bœufs.

La Blonde d'Aquitaine est une race reconnue depuis 1962. C'est la réunion de trois races blondes vivant dans le grand Sud-Ouest. Ces trois races étaient la Blonde des Pyrénées, la Garonnaise, la mieux implantée auparavant, et la Quercy. Ces races étaient élevées pour la viande et les bêtes de trait. Mais l'héritage génétique de la Blonde d'Aquitaine est encore plus complexe car la race appelée Garonnaise n'était que le nom générique de races blondes qui vivaient tout au long du cours de la Garonne ; on dénombrait alors des races locales telles que l'Agenaise, la Marmandaise, la Créon, la Castillonne, l'Entre-Deux-Mers et la Montalbanaise. En 1898, la création du herd-book garonnais permis d'unifier ce cheptel.

Avec 600000 têtes en France, la Blonde d'Aquitaine a largement essaimé en Europe et sur les cinq continents où elle est beaucoup exploitée pour des croisements d'amélioration.

La robe est unie de couleur variable, le plus souvent légèrement froment, mais parfois blonde relativement claire (Figure 24).



Figure 24 : Taureau de race Blonde d'Aquitaine.

5) La Salers

Excellente bouchère, c'est la race idéale pour une économie montagnarde mixte. La Salers est une championne de la productivité grâce à un ensemble de qualités dont la rusticité, la longévité, la fertilité et la facilité de vêlage. Les qualités maternelles sont aussi remarquables. La Salers offre ainsi une qualité et une capacité d'allaitement inégalée au point de produire sans apport d'aliments complémentaires des broutards très lourds en race pure. Son lait riche en matières grasses et protéines permet la fabrication de 4 fromages : le Cantal ou Salers, le Bleu d'Auvergne, le Saint-Nectaire et la Fourme d'Ambert.

Les vaches Salers font partie de l'histoire de Salers et elles y sont présentes depuis toujours. Jadis elles étaient plus petites et on les nommait les rouges. Au milieu du XIX^e siècle, un éleveur, nommé Tyssandier d'Escous, sélectionna et améliora le cheptel, créant ainsi la race Salers, celle visible aujourd'hui, devenue un vrai symbole pour la région. Mais après la dernière guerre, nombreux furent les éleveurs tentés par le rendement en viande qui croisèrent leur race avec la Charolaise, une tentation qui faillit dénaturer définitivement la race Salers. Certains éleveurs réagirent dès 1974 pour relancer la Salers pure, conformément au herd-book créé en 1908.

Aujourd'hui, 180000 vaches Salers vivent dans 85 départements français dans des régions aussi surprenantes pour cette race montagnarde que peuvent l'être la Picardie, la Normandie ou la Région Centre. A l'étranger, la race Salers est aussi présente dans 25 pays sur les cinq continents. Majoritairement exploitée en système allaitant, seules quelques dizaines de troupeaux continuent à pratiquer le système de traite partielle traditionnel.

La robe est rouge foncé presque acajou (Figure 25), mais toujours sans tache ; certaines bêtes ont une robe tellement foncée qu'on peut la qualifier de noire, mais c'est assez rare.



Figure 25 : Vache de race Salers.

6) La Maine-Anjou

La Maine-Anjou est une race exceptionnelle pour ses qualités. Elle est docile et se contente de fourrages grossiers. Précoce et prolifique, elle vêle facilement. Cette race allaitante produit les poids de carcasse les plus élevés, ce qui valorise entre autres les vaches et génisses de réforme.

La race Mancelle était implantée depuis fort longtemps dans cette partie de l'Ouest de la France ; c'était une race mixte de qualité, devant subir des améliorations. Les éleveurs se tournèrent alors vers la race anglaise Durham dont les taureaux étaient connus pour leur stature impressionnante et leur aptitude à l'engraissement. Cette campagne de croisement démarra vers les années 1830 et elle aboutit à la dénomination de la race Durham-Mancelle. Il est toutefois bon de savoir que Durham est le nom adopté par les éleveurs français pour désigner la race Shorthorn. Ce n'est qu'à partir de 1908 que l'on commença à parler de race Maine-Anjou, suite à la création de la Société des Eleveurs de Maine-Anjou. La race a été officiellement reconnue en 1925.

Avec 150000 têtes, les trois quarts des troupeaux vivent dans la région des Pays-de-Loire. La race est maintenant adoptée par différents pays d'Europe, d'Amérique du Nord, au Japon, en Australie et en Nouvelle-Zélande.

La robe pie rouge est relativement foncée sur fond blanc avec des dessins assez bien délimités (Figure 26).



Figure 26 : Vaches de race Maine-Anjou.

7) La Prim'Holstein

La race Prim'Holstein possède une morphologie fonctionnelle unique ; sa mamelle est particulièrement adaptée à la traite mécanique. De plus, elle affiche les meilleures productions en lait, mais aussi en matière protéique grâce à une amélioration constante de la race dans ce but. La Prim'Holstein est une race très précoce avec une vitesse de croissance rapide. Elle donne en outre de très bons résultats à l'engraissement de veaux et taurillons.

Il y a 3000 ans, des tribus germaniques du littoral de la Mer du Nord viennent s'installer dans les plaines du delta du Rhin ; leur bétail les suit. Durant des siècles ces vaches et taureaux vont vivre dans cette région où leur appellation locale va devenir tout naturellement Frisonne, nom de cette région, d'autant que la race est facilement adoptée par les éleveurs bataves. Cette race Pie noire originaire du nord-ouest de l'Europe fut introduite dans le Nord de la France vers les années 1800. Son herd-book fut créé à la fin de la Première Guerre Mondiale. Depuis 1990, elle s'appelle Prim'Holstein ; ce changement s'explique par l'infusion de sang Holstein américain et par la volonté des éleveurs d'établir sa renommée internationale.

Massivement présente en Amérique du Nord mais aussi en Europe, en Afrique du Nord et au Brésil, la population française est de 3 millions de vaches.

La robe est celle des pies noires distribuées en larges plaques noires et blanches bien délimitées (Figure 27). Cependant, les extrémités des pattes et de la queue restent toujours blanches. On rencontre des Prim'Holstein pie rouge, donc à robe rouge et blanche dont l'inscription au herd-book est autorisée depuis quelques années.



Figure 27 : Vache de race Prim'Holstein.

8) La Charolaise

Cette race bouchère est douée d'un très fort potentiel de croissance, d'une excellente capacité d'ingestion qui lui permet d'optimiser les pâturages et de grossir rapidement, alors que son indice de consommation est souvent plus faible que celui d'autres races à viande. Le taux élevé de naissances gémellaires ne pose pas de problème grâce à la bonne production laitière des vaches à grande longévité. Elle est devenue la première race allaitante française.

Le berceau d'origine de la Charolaise se situe dans la vallée de l'arconce, en Saône-et-Loire. Jusqu'au XVIIIe siècle, on y pratique l'élevage de bœufs, utilisés pour le trait puis engraisés pour la boucherie. C'est un bovin Charolais-Nivernais qui obtient le premier prix au concours des animaux de Poissy, ancêtre du Concours général de Paris, en 1865 ; cette consécration va conduire à la création d'un herd-book « race charolaise pure » en 1882. A partir de 1920, le Charolais devient exclusivement un animal de boucherie.

Son succès international doit beaucoup aux croisements effectués avec des races autochtones, par exemple avec le zébu. Présente dans 70 pays sur les cinq continents, on rencontre une forte présence de Charolaises au Brésil ; la France comptant 1950000 vaches mères.

La robe est blanche unie sans la moindre tache (Figure 28) ; il arrive qu'elle soit crème.



Figure 28 : Vache de race Charolaise.

9) La Montbéliarde

La Montbéliarde est avant tout une grande laitière, ayant conservé des qualités d'élevage et des qualités bouchères. Son lait, très apprécié, sert à fabriquer de nombreux fromages (Comté, Bleu de Gex, Munster). Cette race permet aussi une bonne valorisation bouchère, les veaux purs ou croisés Charolais étant très recherchés sur les marchés français et italiens.

L'histoire des hommes, et notamment l'intolérance religieuse a contribué pour beaucoup dans l'évolution de la Montbéliarde. Au XVIII^e siècle, des anabaptistes fuient les persécutions qu'ils subissent dans l'Oberland bernois ; ils partent vers le Jura en emmenant avec eux des vaches et des taureaux bernois, des bêtes qui vont être croisées avec les races locales franc-comtoises de l'époque (la Taurache et la Féméline). Mais toutes ces races ont un point commun, elles font partie du rameau bovin jurassique. La race Montbéliarde est officialisée en 1889 avec la création du herd-book. En 1950, puis en 1980, l'état français demande que la Montbéliarde se fonde dans un groupe Pie rouge, opération que refusent les éleveurs francs-comtois qui finissent par gagner. La Montbéliarde est confirmée comme race bien spécifique.

L'effectif français est estimé à 710000 vaches et ce chiffre place cette race au deuxième rang des laitières françaises. Elle est présente également dans plusieurs pays d'Europe, d'Afrique et d'Amérique.

La robe est pie rouge soutenu aux taches bien délimitées (Figure 29) ; en revanche la tête, le ventre et les membres restent blancs.



Figure 29 : Vache de race Montbéliarde.

C. La génétique de la coloration chez les bovins

La coloration des bovins, bien qu'en apparence secondaire du point de vue économique, a toujours passionné le monde des éleveurs. Il suffit, pour s'en convaincre, de constater l'importance qu'on lui attribue dans la vente des animaux, de suivre les jugements de reproducteurs dans les concours, de lire le luxe de détails concernant la pigmentation de la robe et des muqueuses dans les standards des races. Ainsi, une étude sur la coloration peut présenter l'intérêt de donner une description raisonnée des caractères des diverses races.

Le choix d'une couleur de robe n'est d'ailleurs pas toujours sans influences sur le rendement économique car, à la lumière de diverses études de bioclimatique animale, il semblerait que certaines couleurs assurent mieux que d'autres une bonne adaptation des bovins à des conditions climatiques particulières (Lauvergne, 1966).

En France, où il existe de nombreuses races, ce travail de collationnement a été entrepris par Quittet (Quittet, 1963) et Lauvergne (Lauvergne, 1966), ce dernier abordant l'aspect génétique de la coloration dont la connaissance est utile dans la pratique courante de l'élevage. La connaissance du déterminisme héréditaire de la pigmentation serait également précieuse lors du choix des standards de couleurs de robe des races modernes.

L'étude du contrôle génétique de la couleur de la robe des bovins remonte à 100 ans avec l'étude de l'hérédité de la robe chez la race Shorthorn et ses produits de croisement (Barrington et Pearson, 1906). De nombreuses revues relatives au sujet ont depuis été publiées sur le sujet avec notamment celles d'Ibsen (Ibsen, 1933), Lauvergne (Lauvergne, 1966), Searle (Searle, 1968) et Olson (Olson et Willham, 1982).

Le choix du type sauvage pour la pigmentation des bovins est un choix difficile à faire, mais, la couleur des aurochs d'Europe, l'ancêtre de la plupart (ou de toutes) des races de *Bos Taurus*, semble approprié (Olson, 1980). Les aurochs sont essentiellement marron/rouge à marron/noir avec un anneau foncé au niveau du museau.

Chez le bovin, il existe une grande diversité de la couleur de la robe. Le locus *EXTENSION* (Robbins *et al.*, 1993) joue un rôle important dans cette diversité. Plusieurs allèles de ce gène ont été décrits (Klungland *et al.*, 1999; Klungland et Vage, 1999, 2003). L'allèle E^D (noir dominant), caractérisé par la substitution d'une base, code pour un récepteur constitutivement actif (Klungland *et al.*, 1995). On le rencontre chez les animaux noirs (avec ou sans tâches blanches) comme l'Angus et la Prim'Holstein, alors que l'allèle e (rouge

RACES	COULEUR DU PELAGE	E^+/E^+	E^+/E^1	E^1/E^1	E^D/E^D	e/e
Normande	marron, noir et blanc	o				
Blanc Bleu Belge	roan et blanc	o				
Flamande	marron/noir	o				
Cabannina	marron foncé	o				
Chianina	blanche	o				
Marchigiana	blanche	o				
Piedmontese	grise	o				
Brune des Alpes	grise	o	o	o		
Gascogne	grise	o	o	o		
Aubrac	marron avec noir	o	o	o		
Tarentaise	rouge avec noir	o	o	o		
Vosgienne	noir et blanc				o	
Prim'Holstein	noir et blanc				o	
Abondance	marron et blanc					o
Montbéliarde	rouge et blanc					o
Blonde d'Aquitaine	jaune					o
Charolais	blanc					o
Limousine	rouge					o
Maine Anjou	rouge et blanc					o
Salers	marron					o
Simmental	marron clair et blanc					o
Villards de Lans	marron clair					o

Tableau 3 : Génotypes au locus *EXTENSION* chez les races bovines (d'après (Rouzaud *et al.*, 2000; Maudet et Taberlet, 2002)).

récessif) code un récepteur tronqué à priori inactif (Klungland *et al.*, 1995; Joerg *et al.*, 1996). La plupart des combinaisons de rouge ou marron/rouge avec du noir, comme chez la Normande par exemple, sont le fruit de l'allèle sauvage E^+ . Les travaux de notre équipe ont, quant à eux, permis de mettre en évidence un quatrième allèle E^l caractérisé par une duplication de 12 bases (Rouzaud *et al.*, 2000). Le génotype d'un certain nombre de races a ainsi été établi au locus *EXTENSION* (Rouzaud *et al.*, 2000; Crepaldi *et al.*, 2003) (Tableau 3). Les résultats obtenus permettent de classer les races bovines françaises en deux familles. La série rouge est caractérisée par un génotype e/e avec des robes plutôt phéoméliques, allant du blanc crémeux de la Charolaise à l'acajou foncé de la Salers. La série noire avec des robes plutôt euméliques comportant des proportions variables de noir dues à la présence des allèles E , E^D et E^l .

Pour expliquer le phénotype bringé des races Normande et Texas Longhorn, un allèle Br a été proposé. Celui-ci serait hypostatique sur les allèles E^D et e . En effet, comme les animaux e/e n'ont pas de pigments noirs, ils ne peuvent exprimer les poils noirs qui font partie du patron bringé. L'allèle de ce gène ne semble pas capable de modifier l'expression de la couleur noire produite par E^D . Le phénotype bringé apparaît également dans la descendance de certaines races non bringées comme l'Hereford ou la Red Angus. L'explication de ce phénomène serait que l'allèle Br est masqué par l'allèle e présent dans ces races.

Même si de nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que des mutations homologues aux autres espèces seraient présentes chez le bovin au locus *AGOUTI* (Lauvergne, 1966; Searle, 1968; Olson et Willham, 1982; Adalsteinsson *et al.*, 1995), la nature et le rôle de tels mutants reste largement incompris. Le ventre plus clair de la Limousine et de la Jersey serait dû à un allèle a^i et les modifications du phénotype sauvage observé chez la Brown Swiss, la Brahman et la Chianina seraient dues à un autre allèle (a^w). Adalsteinsson et ses collaborateurs (Adalsteinsson *et al.*, 1995) ont présentés des éléments en faveur d'un allèle noir récessif (a), qui, à l'état homozygote, modifie le phénotype sauvage en un noir uniforme. L'allèle sauvage A permet l'expression de la combinaison de pigmentation rouge et noire du phénotype sauvage. L'homozygotie a/a n'a pas d'effet sur les animaux qui ont un génotype e/e ou $E^D/-$. Des allèles d'*AGOUTI* ayant les mêmes effets sont présents chez les souris, les chiens et les chevaux. (Hustad *et al.*, 1995; Rieder *et al.*, 2001). La race étudiée par Adalsteinsson et ses collaborateurs est la race Islandaise et il y a à ce jour peu de preuves montrant que l'allèle a



Figure 30 : Individu Angus atteint d'albinisme oculocutané (d'après <http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html>).



Figure 31 : Veau albinos de race Prim'Holstein (d'après <http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html>).



Figure 32 : Veau albinos de race Brune (d'après <http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html>)

existe également chez d'autres races, d'autant plus que même chez l'Islandaise, cet allèle est peu fréquent.

Le phénotype roan, mélange de poils pigmentés et de poils blancs, des races Bleu Blanc Belge et Shorthorn s'expliquerait par une mutation dans le gène *MGF (Kit-ligand/Steel)* (Seitz *et al.*, 1999). Ce gène occuperait donc le locus *Roan* dont l'existence a été envisagée il y a de nombreuses années et localisé plus récemment sur le chromosome 5 (Charlier *et al.*, 1996).

Peu de données sont disponibles sur les gènes bovins de la famille tyrosinase. Néanmoins, une mutation de *TYRPI* a été associée avec la couleur dun des vaches Dexter (Berryere *et al.*, 2003). Les cas d'albinisme semblent rares chez les bovins. Cependant, on peut penser que le faible nombre de cas recensés reflète l'élimination précoce de ce genre d'individus dérogeant au standard des races. Chez l'Angus, on observe des cas d'albinisme oculocutané (Cole *et al.*, 1984). Cela affecte la couleur noire de la robe qui devient rouge/noire, mais l'effet principal de cette maladie récessive concerne l'oeil. Il apparaît anormalement blanc (Figure 30). L'animal craint le soleil et on pense que cette atteinte oculaire rend inconfortable la présence de cet animal au soleil. Ces animaux sont d'ailleurs plus à l'aise à l'ombre d'un arbre ou dans une stabulation couverte. L'analyse préliminaire de la séquence génomique codante des gènes *TYR* et *TYRPI* n'a par ailleurs révélé aucune mutation causale (Schmutz *et al.*, 2002).

L'albinisme complet est observé occasionnellement chez les bovins (Figure 31). Il élimine la pigmentation des poils, de la peau, des sabots et du mufle. L'œil apparaît rose et ces animaux essaient toujours de les garder fermés.

Récemment, l'insertion d'une cytosine dans le gène *TYR* causant l'apparition d'un codon stop prématuré a été décrite chez un veau albinos de race Brune (Figure 32) (race originaire de Suisse) (Schmutz *et al.*, 2004).

IV. PROJET D'ETUDE

Mon sujet de thèse s'intègre dans la thématique de recherche de marqueurs moléculaires spécifiques à chacune des races bovines françaises. Ce travail repose sur la mise à profit des allèles des gènes de coloration. L'objectif est de proposer des outils moléculaires appropriés pour une traçabilité raciale des populations bovines et de leurs produits dérivés. En France, le patron de coloration chez le bovin, fruit du travail des sélectionneurs depuis de très nombreuses années, est inscrit au Herd-book de chaque race et constitue ainsi un des critères majeurs pour identifier l'origine raciale d'un individu. Tout animal présentant des défauts de pigmentation est ainsi écarté des schémas de reproduction. L'idée directrice de notre travail est que chaque race bovine étant caractérisée par une couleur de robe qui lui est propre, il doit exister des différences (mutations) au niveau des gènes qui contrôlent la mise en place de cette pigmentation responsables des différentes couleurs observées entre les races.

Ma contribution à la caractérisation génétique de la coloration de la robe des différentes races bovines françaises consiste en l'isolement et l'étude des gènes de la famille tyrosinase : *TYR*, *TYRPI* et *DCT*. Le niveau d'activité de ces trois enzymes régule qualitativement et quantitativement le rapport eumélanine/phéomélanine responsable de la pigmentation chez les mammifères.

Le choix de l'étude de ces trois gènes, parmi la centaine impliquée dans la définition de la coloration chez les mammifères se justifie par : 1) l'interaction directe entre les trois gènes pour la définition d'une coloration donnée, ce qui justifie l'importance de considérer l'étude des trois gènes 2) l'existence de plusieurs mutations qui altèrent la pigmentation chez la souris et les autres mammifères incluant l'Homme, 3) les conclusions que l'on peut tirer de l'étude de leurs niveaux d'expression et qui pourraient orienter le choix de gènes candidats responsables d'un phénotype particulier de coloration de la robe. En effet, l'expression des trois gènes peut renseigner sur le génotype d'autres gènes impliqués dans la définition de la couleur de la robe. A titre d'exemple, les souris de génotype *e/e* au locus *Extension* ne présentent pas d'expression du gène *TYRPI* (Robbins *et al.*, 1993).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel biologique

A. Peau

Les échantillons de peaux bovines ont été récupérés à l'abattoir de Limoges, auprès des UPRA (Unités Nationales de Sélection et de Promotion de Race) des races bovines étudiées et par le biais du Domaine Expérimental du Pin-au-Haras. Les races utilisées dans cette étude sont la Prim'Holstein, la Limousine, la Charolaise, la Salers, la Montbéliarde, la Maine-Anjou, la Gasconne adulte, la Normande et la Blonde d'Aquitaine. Les prélèvements de peaux (généralement 25 cm²) ont été effectués le plus tôt possible après abattage. Après nettoyage sur place par lavage à l'éthanol et rincage à l'eau, les morceaux de peaux sont conservés à 4°C si elles sont traitées dans les 48 heures après abattage ou congelés à -80°C si le traitement est plus tardif.

B. Anticorps

Nous disposons d'un antisérum polyclonal de lapin généré contre un peptide synthétique (KLH-CLLTDQYQCYAEERI-CO₂H) correspondant à la queue C-terminale de TYRP1 humaine. Ces anticorps nous ont été gracieusement fournis par le Dr V. Hearing (NIH, Bethesda, USA).

Pour révéler l'anticorps α -PEP1h, un anticorps secondaire porc-anti lapin couplé à la peroxydase (POD) (DAKO) est utilisé.

II. Préparation d'acides nucléiques

A. Préparations d'ARN totaux de peau

Les échantillons de peau sont traités soit frais, soit après conservation à -80°C. Les poils sont rasés et le tissu adipeux sous-cutané est retiré. L'échantillon est ensuite découpé en petits morceaux d'environ 1 mm², puis broyé. Le broyat est ensuite traité par le kit RNeasy Maxi Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Le principe de ce kit repose sur la purification des ARN totaux par fixation sur un gel de silice.

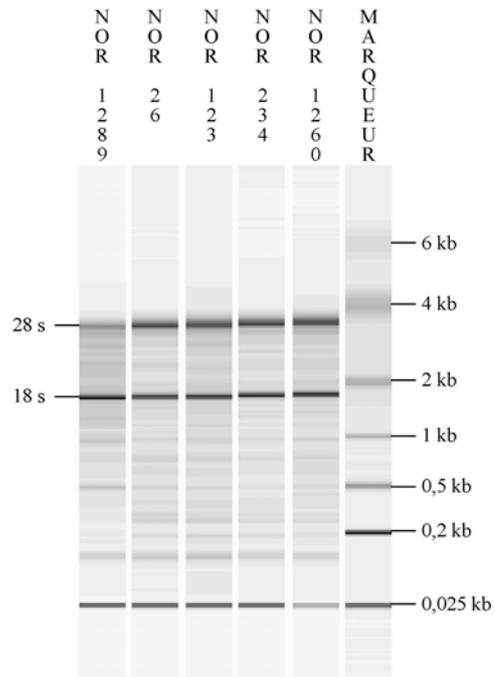


Figure 33 : Profil électrophorétique des ARN totaux de peau de quelques animaux du domaine du Pin-au-Haras.

La qualité et la quantité des ARN extraits sont contrôlées par analyse avec un Agilent 2100 Bioanalyzer et une puce Agilent RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies) (Figure 33). Le marqueur utilisé est le RNA 6000 Ladder (Ambion). Un ARN de 0,025 kb est présent dans tous les échantillons et permet de calibrer la migration.

B. Synthèse d'ADNc

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir de 1 µg d'ARN totaux de peau traités à la DNase, dans un volume final de 20 µL, avec 0,5 µg d'amorce oligo (dT) (Invitrogen) et la SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Life Technologies) conformément aux instructions du fabricant. La réaction est incubée 50 min à 42°C et 15 min à 70°C. Les ADNc sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Au total, des ADNc de trois animaux de chaque race ont été préparés. Ces ADNc sont utilisés pour la recherche de polymorphismes ainsi que pour les études d'expression des gènes de la famille tyrosinase.

III. Préparation de protéines

A. Extraction de protéines de peau

Les échantillons de peau sont traités soit frais, soit après conservation à -80°C. Les poils sont rasés et le tissu adipeux sous-cutané est retiré. L'échantillon est ensuite découpé en petits morceaux d'environ 1 mm², puis broyé dans un appareil FastPrep® FP220A (Q-BIOgene) avec le kit FastRNA® Pro Green Kit (Q-BIOgene). Le tampon utilisé lors de l'extraction est :

Tris-HCl 50 mM, pH 6,8

Glycérol 15% (v/v)

SDS 1% (v/v)

PMSF 1,5 mM

Les tubes de broyage sont ensuite centrifugés 5 min à 12000g. Le surnageant est placé dans un tube neuf et stocké jusqu'à utilisation à -20°C.

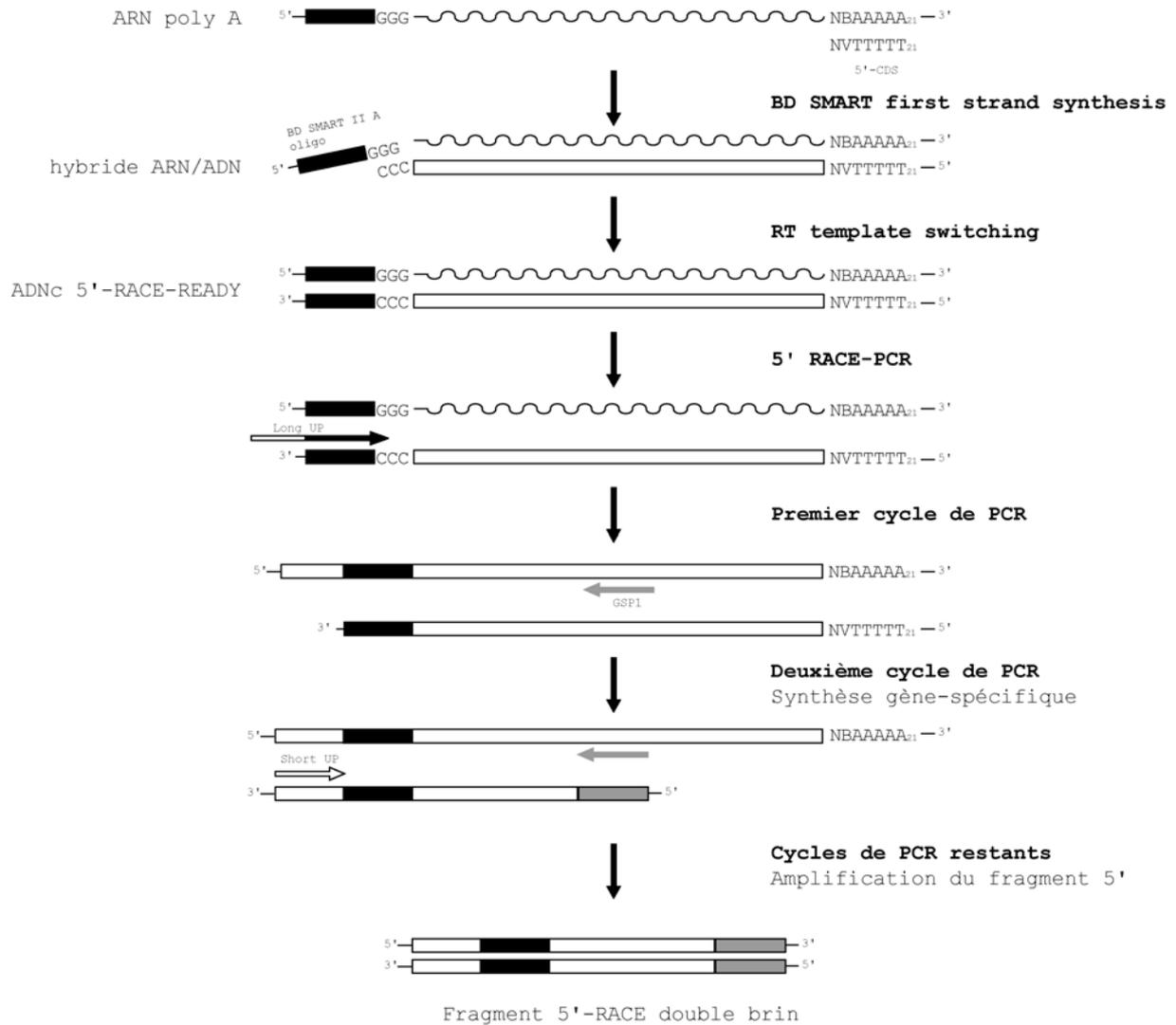


Figure 34 : Schéma du principe d'isolement de la partie 5'UTR d'un transcrit.

B. Dosage des protéines

La concentration des protéines est réalisée grâce à la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le « BIO-RAD protein assay dye reagents » (BIO-RAD S.A., Allemagne). La BSA (Albumine Sérique Bovine) a été utilisée comme protéine standard.

IV. RT-PCR

A. RACE-PCR

La technique de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) permet d'isoler les séquences non-codantes 5' et 3' (UTR) des ADNc d'intérêt. Un kit commercial (BD SMART RACE cDNA Amplification Kit, BD Biosciences Clontech) permet d'ajouter des adaptateurs aux extrémités des ADNc synthétisés par transcription inverse. Ensuite, une amorce choisie dans le gène d'intérêt (GSP1 (Gene-Specific Primer 1) sur la Figure 34 et GSP2 (Gene-Specific Primer 2) sur la Figure 35 et couplée aux amorces Long Up et Short Up permet d'amplifier les régions 5' et 3' UTR du gène d'intérêt.

Les réactions de RACE-PCR ont été réalisées avec 5 µg d'ARN de région noire de Prim'Holstein et le kit SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) conformément aux instructions du fabricant. Des amorces consensus ont été dessinées pour chaque gène sur la base des homologies entre les séquences de l'Homme et de la souris. Les régions 5' et 3' UTR de chaque transcrit d'intérêt ont été amplifiées par PCR nichée avec l'amorce consensus et celle complémentaire de l'adaptateur : *-RACE-5'1/UPM (Universal Primer Mix) et *-RACE-5'2/NUP (Nested Universal Primer) pour la première et seconde amplification du 5' UTR respectivement, et *-RACE-3'1/UPM et *-RACE-3'2/NUP pour la première et seconde amplification du 3' UTR respectivement. * remplace TYR, TYRP1 et DCT (Tableau 4 dans le chapitre D suivant). 5 µL d'une dilution au 1/50^e de la première amplification PCR (diluée en 10 mM Tricine-KOH pH 8,5, 0,1 mM EDTA) ont été utilisés comme matrice pour la seconde amplification avec les amorces nichées. La première et la seconde amplification PCR ont été conduites dans un volume final de 25 µL contenant 10 pmol de chaque amorce et 12,5 µL de 2X working concentration PCR Master Mix (ABgene) dans les conditions suivantes :

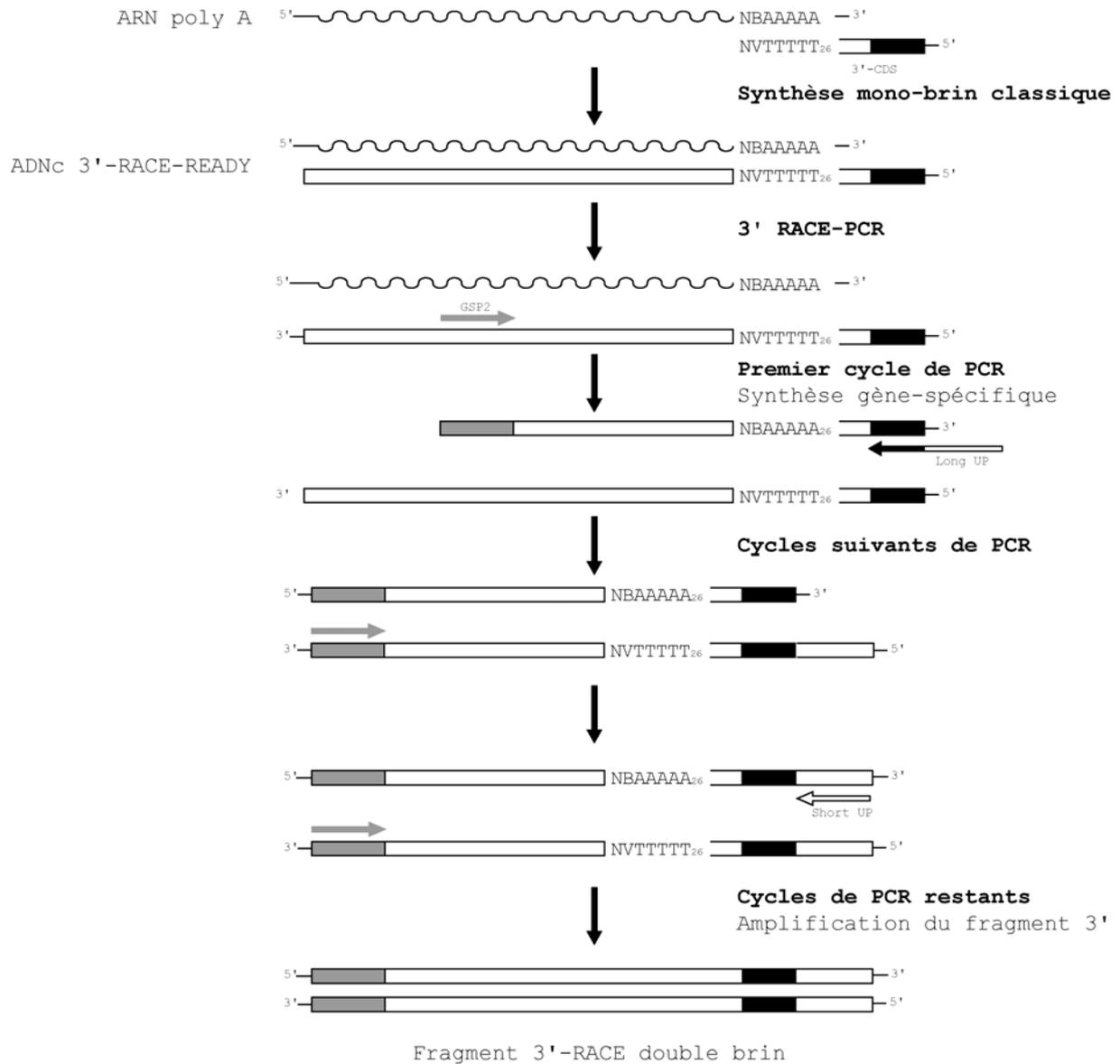


Figure 35 : Schéma du principe d'isolement de la partie 3'UTR d'un transcrit.

dénaturation initiale 2 min à 94°C suivie de 30 cycles (30 s à 96°C, 30 s à 61°C, 2 min à 72°C) et 1 cycle (5 min à 72°C). Les produits d'amplification sont élués et séquencés.

B. RT-PCR classique

A partir des informations de séquences obtenues par RACE-PCR, deux couples d'amorces ont été dessinés pour chaque gène d'intérêt et utilisés pour amplifier la partie codante de chaque gène par PCR nichée. Les amorces spécifiques sont *-5'1/*-3'1 (sens externe/antisens externe) et *-5'2/*-3'2 (sens interne/antisens interne). * remplace TYR, TYRP1 et DCT (Tableau 4 dans le chapitre D suivant). Les premières et secondes amplifications ont été conduites comme décrit précédemment au chapitre I.IV.A. Les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose et séquencés. Le contigage des séquences obtenues en RACE-PCR et issues de l'amplification de la partie codante permet d'établir la séquence totale de l'ADNc de chaque gène grâce au programme AutoAssembler (Perkin-Elmer).

C. RT-PCR semi quantitative

Les analyses sont réalisées en utilisant le fluorochrome SYBR Green I (1X SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)), un intercalant fluorescent de l'ADN. Chaque analyse est faite en triplicat dans une plaque 96 puits. Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer) dans un volume de 25 µl). Le programme d'amplification est de 10 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C puis 1 min à 65°C (hybridation et élongation).

Pour chaque gène d'intérêt (*TYR*, *TYRP1* et *DCT*), un couple d'oligonucléotides est choisi préférentiellement dans la région proche de la queue poly-A du transcrit d'intérêt (Tableau 5). Ces oligonucléotides sont dessinés grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer) et leur spécificité vis à vis du gène d'intérêt est vérifiée par alignement informatique.

Ces différents couples d'amorces doivent être validés expérimentalement. Dans un premier temps, on recherche la concentration optimale en amorce. Trois concentrations en oligonucléotides (50, 300 et 900 nM) sont donc testées afin de déterminer la concentration qui

donne le meilleur signal de fluorescence. Pour cela, les solutions mères à 100 µM sont diluées à deux concentrations différentes : 7,5 µM et 0,625 µM. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl d'ADN à 5 ng/µl, de 12,5 µl de Mix SYBR Green et de 2 µl d'amorces sens et antisens à 0,625 µM (pour une concentration finale de 50 nM) ou de 1 et 3µl d'amorces sens et antisens à 7,5 µM pour une concentration finale de respectivement 300 et 900 nM. Le volume est complété à 25 µl par addition d'eau RNase-free.

L'étape suivante consiste à vérifier la relation entre le nombre de cycles (Ct) nécessaire pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil et le logarithme de la concentration en ADN matrice. Cinq dilutions successives au ¼ de l'ADN matrice sont réalisées. Le mélange réactionnel consiste alors en 12,5 µl de Mix SYBR Green, de 7,5 pmol d'amorce sens (*-QT1) et 7,5 pmol d'amorce antisens (*-QT2) où * remplace TYR, TYRP1, DCT, AGOUTI et GAPDH (Tableau 5 dans le chapitre D suivant) (concentration finale de 300nM), 0,5 µl d'eau RNase-free et de 10 µl d'ADNc test aux concentrations de 2,5, 0,625, 0,156, 0,040 et 0,010 ng/µl. Pour une efficacité de PCR à 100%, la pente de la droite Ct en fonction de log₁₀ de la concentration en ADN matrice doit être égale à -3,32.

Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêt. Le mélange réactionnel dans chaque puits est composé de 10 µl d'ADN (50 ng), 12,5 µl de Mix SYBR Green, de 1 µl d'amorces sens et antisens à 7,5 µM (concentration finale de 300nM), et de 0,5 µl d'eau RNase-free. Un gène calibrateur (*GAPDH*) est utilisé à chaque fois. Ce gène dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression. Le taux d'expression du gène d'intérêt est déterminé par rapport à ce gène calibrateur. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux situations biologiques (Prim'Holstein et autre race) est obtenue par le calcul :

$$[2^{-(\text{Ct gène d'intérêt autre race} - \text{Ct gène d'intérêt Prim'Holstein})}] / [2^{-(\text{Ct gène référence autre race} - \text{Ct gène référence Prim'Holstein})}].$$

Des échantillons de peaux de trois individus par race ont été testés. Trois synthèses indépendantes d'ADNc ont été réalisées sur chaque échantillon de peau comme décrit

précédemment. Chaque ADNc a été analysé en triplicat comme indiqué au début. Tous les résultats sont représentés en considérant la région noire de la Prim'Holstein comme référence biologique car on considère que cet échantillon représente le maximum d'expression des trois gènes d'intérêt. Ainsi, le niveau d'expression dans cet échantillon est fixé à 1. On considère généralement qu'un gène est sous-exprimé quand son taux d'expression est inférieur à 0,5 et qu'il est sur-exprimé quand son taux d'expression est supérieur à 2. Cependant, cette vision des choses peut être contestée.

D. Les oligonucléotides

De nombreux oligonucléotides ont été utilisés dans cette étude, pour le clonage et l'étude de polymorphisme (Tableau 4) ou pour la RT-PCR semi-quantitative (Tableau 5). Leurs positions respectives sont schématisées sur la Figure 36.

NOM	SEQUENCE	POSITION
TYR-RACE5'1	GCTCGAGGGAAGTGGCCAGCGGAGG	132-108
TYR-RACE5'2	CTCCACAGTAGGCAGTACAGGGCAGC	99-74
TYR-RACE3'1	CCGTGGCTCATTGGGGCAGCTGTG	1490-1514
TYR-RACE3'2	ACTGCTGTGCTGGGAGGACTTACTAG	1529-1554
TYR-5'1	TGAAAGGGAAGAGTGTGGCTCCATTAACC	2-30
TYR-5'2	CTCAGGCAGACCGTGTGAAGACCGGAGG	33-60
TYR-3'1	AGTTACTTATTACCAAATGGCATCCTTTCC	1924-1895
TYR-3'2	GAGCTTGAAAAGAACCCTTCGGGGAATGATC	1884-1854
TYRP1-RACE-5'1	TCTGGGCAACACACGCCATTCCTCAAAGCC	267-238
TYRP1-RACE-5'2	GCACACTCTCTTGGGAACTGAGCCCAGGCC	228-199
TYRP1-RACE-3'1	TTTCTGAGATTGTCACCATAGCAGTAGTGG	1560-1589
TYRP1-RACE-3'2	ATCACTGGTTGCGGTCATTTTTGCGGGCGC	1597-1626
TYRP1-5'1	TCTACGTGCCTCGGTCTCTACACAAAGGGC	67-96
TYRP1-5'2	CAAACCAGAAGCTGTCCTGCATTCTTGCT	99-127
TYRP1-3'1	AGTTAGTAACTCAACCTATTATTTTCTAAGC	1826-1796
TYRP1-3'2	TTTATGATTCAAATGCATATGAGAATTACAC	1787-1757
DCT-RACE5'1	AGGCCCAGCCAGTGTGCGTGGTGATCACG	582-553
DCT-RACE5'2	GGTGCGGAGTGTACTTTGCGAGGTCTAAGG	545-516
DCT-RACE3'1	CTGGCCTCGGGAGCTGGCACCCATTGGTCAC	1333-1363
DCT-RACE3'2	AGCAACAAAAGATACACCGAAGAAGCCTAG	1610-1639
DCT-5'1	AGACCAGGAGAAAGCTGGAGAGAAGCAAGG	16-45
DCT-5'2	GTGGAAGGCGAGAGAGAGAGTTCTCCCGG	47-75
DCT-3'1	GAACACGAGGAGGCTTAATCAATCAGTATGG	1939-1909
DCT-3'2	CAGATACCACCAGCTGTCATCAGCTGTACC	1898-1869
RAB38-5'	TCCGCAGCAGGCACCGCGCGGCAGGCGGGCC	1-31
RAB38-3'	CAGCTGCTCTGGCTGTGCCAAATCCTAG	673-646

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage.

Nom, séquence et position respectivement d'après les séquences NM_181001 (*TYR*), NM_174480 (*TYRP1*), AY278108 (*DCT*) et d'après la Figure 47 pour *RAB38*.

NOM	SEQUENCE	POSITION
TYR-QT1	CCCTGCTCATGGAAAAAGAGG	1602-1622
TYR-QT2	AGCGAGGTCAGGTTTTTTGC	1700-1681
TYRP1-QT1	ACTGCTCCAGACAACCTGGG	1499-1518
TYRP1-QT2	GCTATGGTGACAATCTCAGAAATGC	1581-1557
DCT-QT1	TGGTTGTCCTTTTTGCATTGC	1527-1547
DCT-QT2	TCTTTTGTTGCTTAGCTGTGTCTCC	1621-1597
AGOUTI-QT1	TGTGCTTCCTCACTGCCTACA	44-64
AGOUTI-QT2	GATGAAAGGAACCTGAAGAACAACCTC	119-94
GAPDH-QT1	GTGAAGCAGGCGTCAGAGG	748-766
GAPDH-QT2	TTGAAGTCGCAGGAGACAACC	824-804

Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR semi-quantitative.

Nom, séquence et position respectivement d'après les séquences NM_181001 (*TYR*), NM_174480 (*TYRP1*), AY278108 (*DCT*), U85042 (*GAPDH*) et AJ002025 (*AGOUTI*).

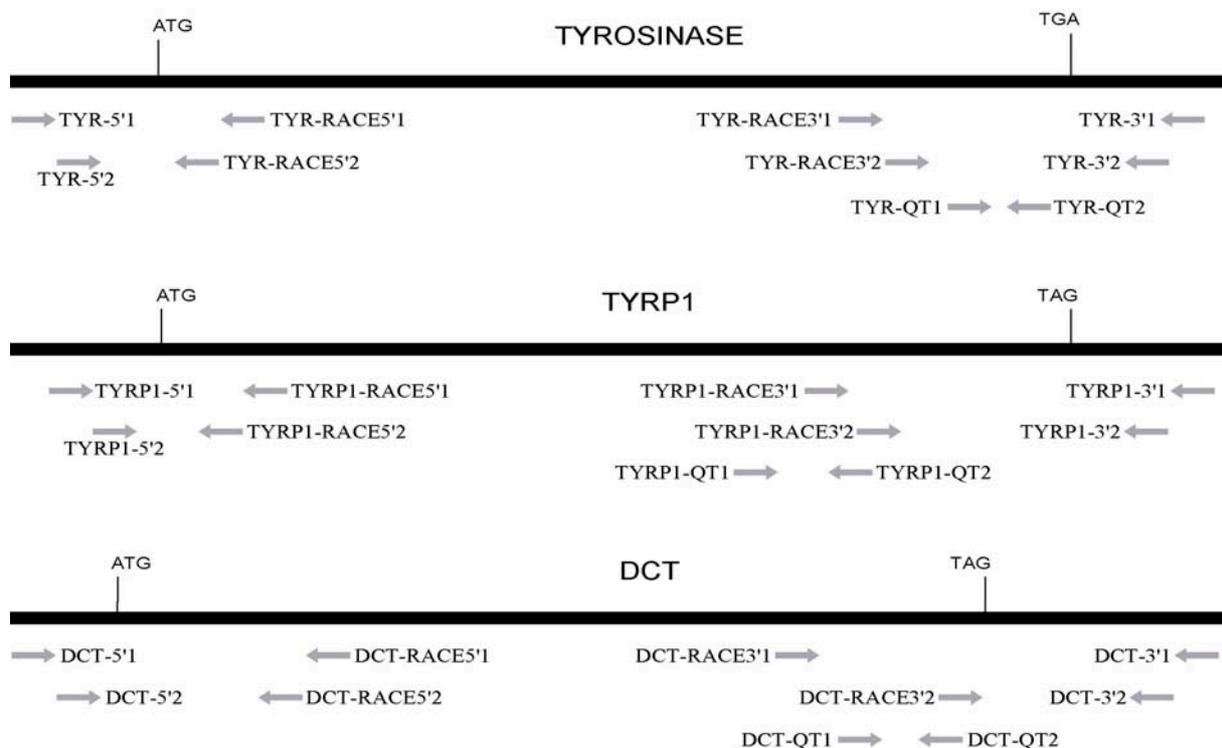


Figure 36 : Schéma de la localisation des amorces sur les gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*.

V. Electrophorèse d'acides nucléiques et purification

A. Electrophorèse en gel d'agarose

Les analyses se font par électrophorèse en gel d'agarose (dont la concentration varie en fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés) contenant du Bromure d'Étidium (Bet 0,5 µg/mL). Le tampon utilisé est du TAE 1X (Tris 40 mM, acide acétique 80 mM, EDTA 1 mM pH 8,3). La migration s'effectue à 10 V/cm de gel environ. L'échantillon d'ADN auquel est ajouté du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, glycérol 40%) est déposé sur gel. Un marqueur de taille (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) est déposé en regard des échantillons et permet d'estimer la taille des fragments d'ADN.

B. Purification de fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose

Le système d'extraction commercialisé par Qiagen (QIAquick gel extraction Kit, Qiagen, France) a été utilisé car il permet l'extraction de fragments de tailles allant de 40 pb à 10 kpb. Son principe repose sur l'adsorption de l'ADN sur un gel de silice.

VI. Séquençage

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon le principe de la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer). Les réactions de séquençage de produits purifiés après séparation sur gel d'agarose sont menées grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable. Elles nécessitent environ 200 à 400 ng de matrice, un mélange réactionnel commercial (Terminator Ready Mix, PRISM Ready Reaction Ampli *Taq* FS, Perkin Elmer) contenant les dNTPs, les ddNTPs, le MgCl₂ et l'ADN polymérase (*Taq* FS) ainsi que 15 pmol d'amorce. Vingt-cinq cycles sont réalisés dans un volume final de 20 µL : dénaturation à 96°C 10 s, hybridation de l'amorce à 55°C 5 s et élongation à 60°C 4 min. l'ADN néosynthétisé est précipité par 80 µL d'isopropanol 75%, lavé par 250 µL d'isopropanol 75% afin d'éliminer les réactifs non

utilisés qui pourraient perturber la migration, séché puis repris dans 20 μ L de TSR avant d'être dénaturé par traitement thermique à 96°C pendant 5 min.

VII. Western-Blot

A. Electrophorèse en gel tricine-polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS/PAGE) permet la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur taille. La technique utilisée est celle de Laemmli (Laemmli, 1970).

Composition du gel de séparation :

- acrylamide/bisacrylamide (29:1, 40%) :	3,58 mL
- Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 :	8 mL
- glycérol 40% :	6 mL
- SDS 20% :	120 μ L
- H ₂ O :	6,1 mL
- TEMED :	8 μ L
- APS 10% (p/v) :	80 μ L

Composition du gel de concentration:

- acrylamide/bisacrylamide (29:1, 40%) :	800 μ L
- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 :	2,48 mL
- SDS 20% :	36 μ L
- H ₂ O :	6,72 mL
- TEMED :	8 μ L
- APS 10% (p/v) :	80 μ L

Le gel de séparation, dont la polymérisation commence dès l'addition de l'APS et du TEMED, est coulé entre deux plaques de verre et recouvert d'isobutanol saturé en eau. Ceci permet d'assurer la planéité et d'empêcher le contact avec l'air qui inhibe la polymérisation. Dès que la polymérisation est complète (1 heure environ), l'isobutanol est éliminé et la

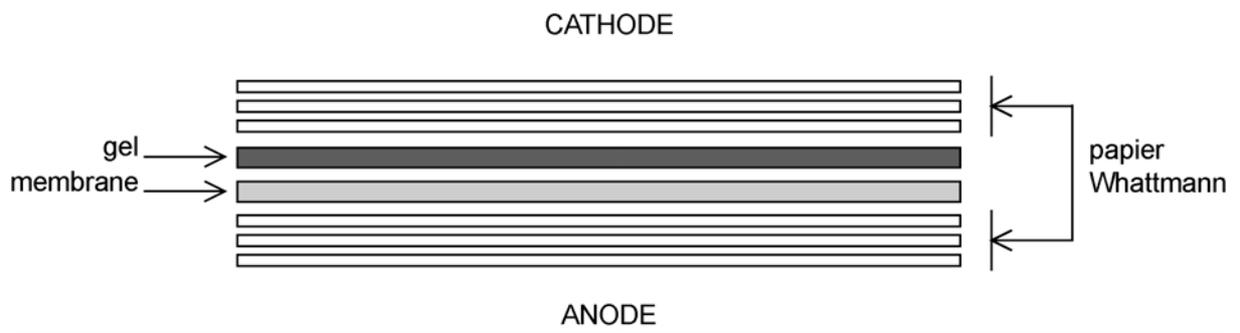


Figure 37 : Schéma du montage de transfert des protéines en système semi-sec.

surface du gel est rincée plusieurs fois à l'eau distillée. Le gel de concentration est alors coulé et surmonté d'un peigne. Avant d'être déposés dans les puits ainsi formés, les échantillons, dilués dans un volume équivalent de tampon d'échantillon, sont dénaturés 4 minutes à 96°C. La migration s'effectue sous un courant de 20 mA appliqué à travers le gel pendant 3 heures grâce à deux tampons :

- le tampon cathode situé en haut du gel :
 - Tris-HCl 0,5 M
 - Tricine 0,45 M
 - SDS 0,01% (p/v)

- le tampon anode situé en bas du gel et vers lequel migrent les protéines : Tris-HCl 1 M, pH 8,9

La migration est réalisée dans un appareil Mighty Small II (Hoefer, Scientific Instruments, San Francisco).

- Composition du tampon d'échantillon 2X :
- Tris-Hcl : 10 mM, pH 8
 - Glycérol : 5%
 - SDS : 2,5%
 - 2 mercaptoéthanol : 5%
 - Bleu de bromophénol : 0,005%

B. Transfert actif sur membrane de nitrocellulose

En fin de migration, le gel est démoulé et placé sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL Nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech)) imprégnée de tampon de transfert. Le montage suivant est réalisé (Figure 37).

Le transfert est réalisé sous un courant de 200 mA pendant 40 min à une heure. Après le transfert, la membrane est colorée 10 minutes au rouge Ponceau afin de visualiser les protéines, puis rincée abondamment à l'H₂O mQ.

- Composition du tampon de transfert :
- Tris base : 48 mM
 - Glycine : 39 mM
 - SDS : 1,3 mM
 - Méthanol : 20% (p/v)

Avant addition du méthanol, le pH de ce tampon est ajusté à 9,2.

C. Hybridation

La membrane est ensuite saturée dans une solution de Western Blocking Reagent 1% (Roche) une nuit à 4°C ou 1 heure à température ambiante. L'hybridation de l'anticorps primaire, dilué dans du Western Blocking Reagent 0,5%, est ensuite conduite pendant 1 heure à température ambiante ou une nuit à 4°C. Après deux lavages en TBST (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5) pendant 10 min et deux autres en Western Blocking Reagent 0,5%, l'anticorps secondaire dilué en Western Blocking Reagent 0,5% est incubé 1 heure à température ambiante. Finalement, on effectue 4 lavages en TBST pendant 15 minutes chacun.

D. Révélation

La révélation des westerns-blot est réalisée grâce au réactif de chemiluminescence (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche)) dans lequel la membrane est incubée une minute à l'obscurité. Ce réactif contient du luminol et du peroxyde d'hydrogène. Sous l'effet de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire, le luminol est oxydé en présence d'H₂O₂. Le produit ainsi formé émet de la lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt. Ce « spot » impressionne, après un temps variable selon son intensité, un film autoradiographique.

Après séchage entre deux papiers Whattmann, la membrane est incubée une minute avec le réactif de chemiluminescence. L'excès de liquide est retiré et la membrane est placée sous film plastique. On expose un film autoradiographique dans une cassette.

RESULTATS

DISCUSSION

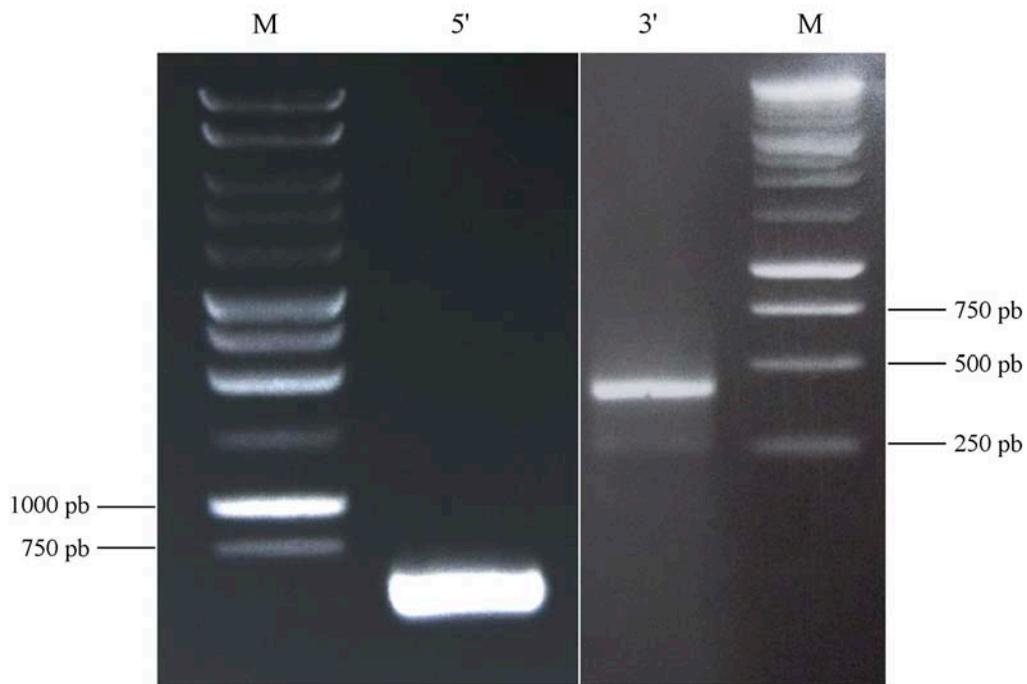


Figure 38 : Exemple type d'amplification par RACE-PCR ; cas de l'obtention des régions 5' et 3' non traduites de *DCT* de la race Charolaise.

5' : amplification du 5' ; 3' : amplification du 3' ; M : marqueur de poids moléculaire.

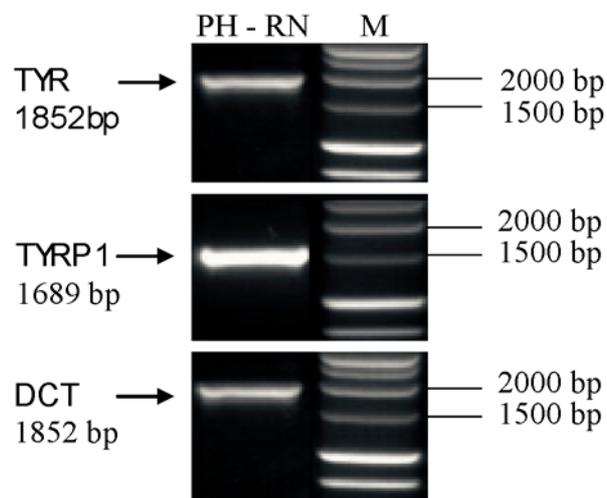


Figure 39 : Amplification de la partie codante des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* chez la Prim'Holstein.

PH-RN : Prim'Holstein région noire, M : marqueur de poids moléculaire.

I. Clonage des ADNc des gènes de la famille tyrosinase

A. Isolement des régions non codantes

L'isolement des régions 5' et 3'UTR a été réalisé grâce à des oligonucléotides définis (GSP1 et GSP2 sur les Figure 34 et Figure 35 dans la section Matériels et Méthodes) dans les régions d'homologies entre les séquences humaines et murines. L'amplification par PCR nichée a été réalisée sur une banque d'ADNc créée avec le kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) avec les amorces *-RACE-5'1/UPM (Universal Primer Mix) en première PCR et *-RACE-5'2/NUP (Nested Universal Primer) en seconde PCR (où * signifie TYR, TYRP1 et DCT). Pour la région 3' UTR, les couples *-RACE-3'1/UPM et *-RACE-3'2/NUP ont été utilisés. Les amplifiats obtenus sont séparés en gel d'agarose (Figure 38). Nous avons obtenu des fragments de 129 pb, 228 pb et 575 pb respectivement pour les régions 5'UTR des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*, et de 306 pb, 184 pb et 424 pb respectivement pour les régions 3'UTR des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*. Les fragments d'intérêt sont élués. Les éluats sont directement utilisés comme matrice pour le séquençage, évitant ainsi les étapes de clonage et de préparation d'ADN plasmidique.

B. Amplification et séquençage de la partie codante des gènes

TYR, *TYRP1* et *DCT*

1) Amplification de la partie codante des gènes de la famille tyrosinase

Après analyse des séquences non codantes 5' et 3', de nouvelles amorces ont été définies dans les régions 5' et 3' UTR. Ces amorces permettent d'amplifier par PCR nichée la partie codante de ces gènes grâce aux couples *-5'1/*-3'1 en première PCR et *-5'2/*-3'2 en deuxième PCR (où * remplace TYR, TYRP1 et DCT). Les amplifiats obtenus, de 1852 pb, 1689 pb et 1852 pb respectivement pour *TYR*, *TYRP1* et *DCT*, sont séparés en gel d'agarose (Figure 39), élués et séquencés.

L'assemblage des séquences des régions UTR et des parties codantes permet de reconstituer l'intégralité de la séquence des ADNc des gènes de la famille tyrosinase. Ces

	<i>TYR</i>		<i>TYRPI</i>		<i>DCT</i>	
	taille chez l'Homme	taille chez le bovin	taille chez l'Homme	taille chez le bovin	taille chez l'Homme	taille chez le bovin
Exon 1	1321	883	30	24	709	367
intron 1	12431		433	449	10582	
Exon 2	217	217	472	468	300	300
intron 2	36406		1135		2488	
Exon 3	148	148	323	323	101	101
intron 3	56804		2615		1026	
Exon 4	182	182	205	205	167	167
intron 4	10190		3617		3790	
Exon 5	516	623	172	172	180	180
intron 5			2089		2099	
Exon 6			176	176	136	136
intron 6			3293		16791	
Exon 7			147	147	202	202
intron 7			835		4041	
Exon 8			281	284	496	476

Tableau 6 : Structure des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT* humains et bovins.

séquences ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accèsion NM_181001 pour *TYR*, AF445638 pour *TYRP1* et AY278108 pour *DCT*.

2) Analyse des séquences nucléotidiques des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*

Les séquences d'ADNc bovin ont été alignées avec les séquences génomiques humaines contenant les orthologues humains de ces gènes (AP000720, AL138753, AL139318.9 respectivement pour *TYR*, *TYRP1* et *DCT*). Ces alignements, réalisés grâce au programme Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>), permettent de déduire la structure exon/intron putative de ces gènes chez le bovin. Ainsi, *TYR* comporterait 5 exons, *TYRP1* 7 exons dont le premier est non codant et *DCT* 8 exons. Ces structures, détaillées dans le Tableau 6, sont identiques à celles observées chez l'Homme et la souris.

3) Analyse des séquences peptidiques déduites des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT*

Les séquences peptidiques des enzymes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* partagent tous les domaines caractéristiques décrits chez leurs orthologues humaines et murines (Figure 40, Figure 41, Figure 42).

Le peptide signal qui adresse le polypeptide naissant est conservé chez les trois enzymes. Le site de clivage du peptide signal, entre 18G et 19H pour *TYR*, entre A24 et Q25 pour *TYRP1* et entre A23 et Q24 pour *DCT*, est conservé chez les trois espèces ; sauf pour *DCT* où le site de clivage humain est différent (G23 et Q24).

Les enzymes bovines sont potentiellement glycosylées puisque les sites potentiels de N-glycosylation sont conservés pour la plupart chez les autres espèces. Il est intéressant de remarquer que le site N111 de *TYR*, inoccupé chez la souris (Branza-Nichita *et al.*, 2000), est absent chez le bovin.

La conservation des résidus His dans les domaines CuA et CuB permettent de prédire que *TYR* et *DCT* sont capables de lier un métal divalent, le cuivre et le zinc, respectivement (Solano *et al.*, 1994; Furumura *et al.*, 1998). La nature de l'atome pouvant se lier à *TYRP1* est quant à elle largement méconnue (Furumura *et al.*, 1998). Le quatrième résidu His localisé entre la première paire d'histidine et le dernier résidu histidine dans le motif CuB de *TYRP1* et *DCT* est conservé entre les trois espèces. Chez *TYR*, le résidu histidine central est remplacé

par P378 chez le bovin et Q378 chez l'Homme et la souris. Il a été démontré que la substitution de Q (chez TYR) par H (chez TYRPs) réduits grandement l'affinité pour la L-DOPA. Ceci est en accord avec l'activité tyrosinase faible voire nulle que présentent les TYRPs (Olivares *et al.*, 2002).

Les signaux sophistiqués portés par la région C-terminale des enzymes de la famille tyrosinase sont conservés chez les trois espèces. Ils comprennent le motif di-leucine partagé par TYR et TYRP1, et le motif « tyrosine-based » partagé par les trois enzymes. Les deux types de motifs semblent impliqués dans l'adressage au mélanosome de TYR et TYRP1 alors que le motif « tyrosine-based » semble seul impliqué dans l'adressage de DCT, cette enzyme étant dépourvue de motif di-leucine (Garcia-Borron et Solano, 2002).

D'autres éléments comme les clusters de cystéine et le domaine transmembranaire sont conservés chez la famille tyrosinase des trois espèces. Le deuxième cluster de cystéines présente lui aussi une analogie avec les motifs EGF-like PS00022 et PS01248 (présents dans la banque Prosite, <http://au.expasy.org/prosite/>) et pourrait ainsi médier la formation d'un complexe tripartite chez le bovin, à l'instar de ce qu'on observe chez l'Homme (Davis, 1990; Orlow *et al.*, 1994; Jimenez-Cervantes *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1998; Manga *et al.*, 2000)

Parmi les deux sérines en position 523 et 527 phosphorylées chez TYR humaine (Park *et al.*, 1999), seule celle en position 528 est conservée chez le bovin. La phosphorylation de S528 et son implication dans l'activation de TYR chez le bovin reste à clarifier.

Globalement, toutes les caractéristiques observées chez la famille tyrosinase bovine permettent de penser que ces enzymes possèdent tous les éléments nécessaires à leur repliement, maturation, glycosylation et adressage correct sous la forme d'enzyme active dans le mélanosome.

	M L	2
ctgaaaggggaagagtgtggctccattaaccagctcaggcagaccgtgtgaagaccggaggaaga	ATG CTC	70
L A A L Y C L L W S F R T S A G H F		20
CTG GCT GCC CTG TAC TGC CTA CTG TGG AGT TTC CGA ACC TCC GCT GGC CAC TTC		124
P R A C A S S K S L T E K E C C P P		38
CCT CGA GCC TGT GCC TCC TCC AAG AGC CTG ACG GAG AAG GAG TGC TGC CCG CCC		178
W A G D G S P C G R L S G R G S C Q		56
TGG GCG GGC GAT GGG AGC CCC TGT GGC CGG CTC TCA GGC AGG GGC TCC TGC CAG		232
D V I L S T A P L G P Q F P F T G V		74
GAC GTC ATT CTG TCC ACG GCA CCA CTC GGA CCT CAG TTC CCC TTC ACG GGG GTG		286
D D R E S W P S I F Y N R T C Q C F		92
GAC GAC CGC GAG TCT TGG CCC TCC ATC TTT TAT AAC AGA ACC TGC CAG TGC TTT		340
S N F M G F N C G S C K F G F R G P		110
AGC AAC TTC ATG GGA TTC AAT TGC GGA AGT TGT AAG TTT GGA TTT AGG GGA CCC		394
R C T E R R L L V R R N I F D L S V		128
CGC TGC ACA GAA AGG CGA CTT TTG GTG AGA AGA AAC ATC TTT GAT TTG AGT GTC		448
P E K N K F L A Y L T L A K H T T S		146
CCA GAG AAG AAC AAG TTT CTT GCC TAT CTC ACT TTG GCA AAA CAT ACC ACC AGC		502
P D Y V I P T G T Y G Q M N H G T T		164
CCA GAC TAC GTC ATC CCC ACG GGC ACC TAT GGC CAA ATG AAT CAT GGA ACA ACA		556
P L F N D V S A Y D L F V W M H Y Y		182
CCC CTG TTT AAT GAC GTC AGT GCT TAC GAC CTC TTT GTC TGG ATG CAT TAT TAT		610
V S R D T L L G D S E V W R D I D F		200
GTG TCA AGG GAC ACG CTG CTT GGG GAC TCT GAA GTC TGG AGA GAC ATT GAT TTT		664
A H E A P G F L P W H R L F L L L W		218
GCT CAT GAA GCC CCA GGT TTC CTG CCT TGG CAT AGA CTC TTC CTG CTG CTG TGG		718
E Q E I Q K L T G D E N F T I P Y W		236
GAA CAG GAA ATC CAG AAG CTG ACC GGG GAT GAG AAC TTC ACG ATT CCA TAC TGG		772
D W R D A E N C D V C T D E Y M G G		254
GAC TGG AGA GAT GCA GAA AAC TGT GAC GTT TGC ACA GAT GAG TAC ATG GGA GGG		826
R N P A N P N L L S P A S F F S S W		272
CGC AAC CCT GCA AAC CCT AAT CTA CTC AGC CCA GCA TCC TTC TTC TCC TCT TGG		880
Q I V C S R L E E Y N S R Q A L C N		290
CAG ATC GTC TGC AGC AGA CTG GAG GAG TAC AAC AGT CGC CAG GCT TTA TGC AAC		934
G T S E G P L L R N P G N H D K A R		308
GGG ACG TCT GAG GGA CCA TTA CTG CGC AAT CCT GGA AAC CAC GAC AAA GCC AGG		988
T P R L P S S A D V E F C L S L T Q		326
ACC CCG AGG CTC CCC TCC TCG GCT GAT GTG GAG TTT TGC CTG AGT TTG ACC CAG		1042
Y E S G S M D K A A N F S F R N T L		344
TAT GAA TCA GGT TCC ATG GAT AAA GCT GCC AAT TTC AGC TTT AGA AAT ACC CTG		1096
E G F A D P V T G I A D A S Q S S M		362
GAA GGA TTT GCT GAT CCA GTT ACT GGG ATA GCA GAT GCC TCT CAA AGC AGT ATG		1150

suite page suivante →

<u>H</u> N A L <u>H</u> I Y M N G T M S Q V P G S	380
CAC AAT GCC TTG CAC ATC TAC ATG AAC GGA ACG ATG TCC CAG GTA CCA GGA TCT	1204
A N D P I F L L H <u>H</u> A F V D S I F E	398
GCC AAT GAT CCC ATC TTC CTT CTT CAT CAC GCG TTT GTT GAC AGT ATT TTT GAA	1258
<u>Q</u> W L R K Y H P L Q D V Y P E A N A	416
CAG TGG CTT CGA AAG TAT CAT CCT CTT CAA GAT GTT TAT CCA GAA GCT AAT GCA	1312
P I G H N R E S Y M V P F I P L Y R	434
CCC ATT GGG CAC AAC CGG GAA TCC TAC ATG GTT CCT TTC ATC CCT CTC TAC AGA	1366
N G D F F I S S K D L <u>G Y D Y</u> S Y L	452
AAC GGT GAC TTC TTT ATT TCA TCC AAA GAT CTA GGC TAC GAC TAT AGC TAC CTA	1420
Q D S E P D I F Q D Y I K P Y L E Q	470
CAA GAT TCA GAA CCG GAC ATT TTT CAA GAT TAC ATT AAG CCC TAC TTA GAA CAA	1474
A Q R I W P <u>W L I G A A V V G S V L</u>	488
GCG CAA CGA ATC TGG CCG TGG CTC ATT GGG GCA GCT GTG GTT GGG TCC GTC CTT	1528
<u>T A V L G G L T S</u> L L C R R K R N Q	506
ACT GCT GTG CTG GGA GGA CTT ACT AGC CTG TTA TGT CGT CGA AAG AGA AAC CAG	1582
L P E E K Q <u>P L L M E K E D Y H N L</u>	524
CTT CCA GAA GAA AAG CAG CCC CTG CTC ATG GAA AAA GAG GAT TAC CAC AAT TTG	1636
M Y Q <u>S</u> H L *	531
ATG TAT CAG AGC CAT TTA TGA aaggtttaggcaatagagctggggcaaaaaacctgacctcgct	1700
ataacttaaatgatgttaaagtccccaggggatgtcccagcggaatccttgatgtgtctctggagacc	1772
ttatcaaaaactgttatcaatacaaaaatgtagccctcctcctactcaggtagaagccacctgtgcttgtttg	1844
ctggatthttgatcattccccgaagggttcttttcaagctcaaatthccatggaaaggatgccatttggtaat	1916
aagtaactataaatgtatctgaattaacgtgctcttgtaaaatagggaaacgattgtgattcttttctctt	1988
gattgtggaatgaacttggtccctttattatcccctttctttaattttatataaatagcaacaaattht	2056

Figure 40 : Structure de l'enzyme TYR bovine.

Exons : bleu et orange ; parties non codantes : minuscules ; parties codantes : majuscules ; signal de polyadénylation : gras ; peptide signal : surlignage bleu ; clusters de cystéines : surlignage jaune ; sites catalytiques : surlignage vert ; domaine transmembranaire : surlignage violet ; motifs importants pour le maintien de la structure globulaire : surlignage gris ; cystéines conservées : rouge ; histidines catalytiques : rouge souligné ; sites potentiels de N-glycosylation : vert ; motifs d'adressage : souligné ; sérine phosphorylable : rose.

agagaatgccttcaggagttcaagcttgatttttatctacgtgcctcggctctctacacaaagggctgcaaac	72
M K S P T L L S L	9
cagaagctgtcctgcattcttgcttcaagcaga ATG AAA TCT CCT ACA CTC CTC TCT CTG	132
G Y M F L V L L F F Q Q A W A Q F P	27
GGT TAC ATG TTC CTA GTC CTG CTT TTT TTC CAG CAG GCC TGG GCT CAG TTC CCA	186
R E C A T I E A L R N G V C C P D L	45
AGA GAG TGT GCT ACC ATT GAG GCT TTG AGG AAT GGC GTG TGT TGC CCA GAC CTG	240
S P L S G P G S D R C G L S S G R G	63
TCC CCA CTG TCT GGG CCT GGG TCT GAC CGC TGC GGT CTC TCA TCA GGG AGG GGC	294
R C E V V I A D S R P H S H H Y P H	81
AGA TGT GAG GTG GTG ATA GCC GAC TCC CGG CCC CAC AGC CAC CAC TAC CCG CAC	348
D G R D D R E G W P T R S F N R T C	99
GAT GGC AGA GAT GAC CGA GAG GGC TGG CCC ACA CGC TCC TTC AAC AGG ACA TGC	402
H C N G N F S G H N C G T C R P G W	117
CAC TGC AAT GGC AAT TTC TCA GGA CAC AAC TGT GGA ACC TGC CGC CCT GGC TGG	456
G G A A C D Q R V L T V R R N L L D	135
GGA GGG GCT GCC TGT GAC CAG AGG GTT CTC ACA GTC AGG AGA AAC CTT CTG GAC	510
L S T E E K N R F V R A L D M A K R	153
TTA AGC ACA GAA GAA AAG AAC CGC TTT GTC CGG GCC CTG GAT ATG GCA AAG CGC	564
T T H P Q F V I A T R R S E E I L G	171
ACC ACT CAC CCT CAG TTT GTC ATT GCC ACA AGG AGG TCA GAA GAA ATA CTG GGG	618
P D G N T P Q F E N I S I Y N Y F V	189
CCA GAT GGC AAC ACA CCG CAG TTT GAG AAC ATT TCC ATT TAT AAC TAC TTC GTT	672
W T H Y Y S V K K T F L G A G Q E S	207
TGG ACA CAC TAC TAC TCA GTC AAA AAG ACT TTC TTG GGA GCA GGA CAG GAA AGC	726
F G E V D F S H E G P A F L T W H R	225
TTT GGT GAG GTG GAT TTC TCT CAC GAG GGA CCA GCA TTT CTC ACC TGG CAC AGG	780
Y H L L Q L E R D M Q E M L Q D P S	243
TAC CAC CTG CTG CAG CTG GAG AGA GAC ATG CAG GAA ATG TTG CAG GAT CCT TCT	834
F S L P Y W N F A T G K N T C D I C	261
TTC TCC CTC CCT TAC TGG AAT TTT GCC ACT GGG AAG AAC ACC TGC GAC ATT TGC	888
T D D L M G S R S N F D S T L I S P	279
ACC GAT GAC TTG ATG GGA TCA AGA AGC AAC TTT GAT TCC ACT CTT ATA AGC CCG	942
N S V F S Q W R V V C E S L E D Y D	297
AAC TCT GTC TTT TCT CAA TGG CGA GTG GTC TGC GAA TCC TTG GAA GAT TAT GAT	996
T L G T L C N S T E G G P I K R N P	315
ACC CTG GGA ACC CTT TGC AAC AGC ACT GAG GGT GGG CCA ATT AAG AGA AAC CCA	1050
A G N V A R P M V Q R L P K P Q D V	333
GCT GGA AAT GTG GCC AGG CCA ATG GTG CAA CGT CTT CCT AAA CCA CAG GAT GTC	1104
A Q C L E V G S Y D T P P F Y S N S	351
CGC CAG TGC TTG GAA GTT GGT TCA TAT GAC ACA CCT CCT TTT TAT TCT AAT TCT	1158

suite page suivante →

T N S F R N T V E G Y S H P T G R Y	369
ACA AAC AGC TTC CGA AAC ACA GTG GAA GGT TAC AGT CAT CCC ACA GGA AGG TAT	1212
D P A V R S L H N L A H L F L N G T	387
GAC CCT GCT GTG CGA AGC CTT CAC AAT TTG GCT CAT CTA TTC CTG AAT GGA ACA	1266
G G Q T H L S P N D P I F V L L H T	405
GGG GGA CAA ACT CAT TTA TCT CCC AAT GAT CCT ATT TTT GTC CTC CTA CAT ACA	1320
F T D A V F D E W L R R Y N A D I S	423
TTC ACT GAT GCA GTA TTT GAT GAA TGG CTG AGG CGA TAC AAT GCT GAT ATA TCC	1374
T Y P L E N A P I G H N R Q Y N M V	441
ACA TAT CCA CTG GAA AAT GCC CCT ATT GGA CAT AAC AGA CAA TAC AAT ATG GTA	1428
P F W P P V T N I E M F V T A P D N	459
CCA TTT TGG CCT CCA GTT ACC AAC ATA GAA ATG TTT GTT ACT GCT CCA GAC AAC	1482
L G Y T Y E V Q W P S R S F S I S E	477
CTG GGC TAT ACT TAC GAA GTT CAA TGG CCA AGT CGG AGT TTT AGC ATT TCT GAG	1536
I V T I A V V A A L S L V A V I F A	495
ATT GTC ACC ATA GCA GTA GTG GCT GCA TTA TCA CTG GTT GCG GTC ATT TTT GCG	1590
G A S C L I R A R S N M D E A N Q P	513
GGC GCT TCT TGT CTG ATT CGT GCC AGA AGC AAC ATG GAT GAA GCA AAT CAG CCT	1644
L L T D Q Y Q H Y I E E Y E K I H N	531
CTC CTT ACT GAT CAG TAT CAA CAC TAC ATT GAA GAA TAT GAA AAA ATC CAT AAT	1698
P N Q S V V *	538
CCT AAC CAG TCT GTG GTC TAG tgacaagtgtaattctcatatgcatttgaatcataaaaaccac	1762
atgcttagaaaaataataggttgagttactaactgt	1797

Figure 41 : Structure de l'enzyme TYRP1 bovine.

Exons : bleu et orange ; parties non codantes : minuscules ; parties codantes : majuscules ; signal de polyadénylation : gras ; peptide signal : surlignage bleu ; clusters de cystéines : surlignage jaune ; sites catalytiques : surlignage vert ; domaine transmembranaire : surlignage violet ; motifs importants pour le maintien de la structure globulaire : surlignage gris ; cystéines conservées : rouge ; histidines catalytiques : rouge souligné ; sites potentiels de N-glycosylation : vert ; motifs d'adressage : souligné ; motif reconnu par les protéines à domaine PDZ : double souligné.

gcaagagtggaaggaagaccaggagaaagctggagagaagcaaggagtggaaggcgagagagagagagttctcc	72
M S P L G W G L L L G C L G	14
cgtttctaaagcc ATG AGC CCC CTT GGG TGG GGG CTT CTG CTC GGC TGT CTG GGT	127
C A L P S G A R A Q F P R V C M T V	32
TGT GCG CTC CCG TCG GGG GCC CGG GCG CAG TTC CCC AGG GTC TGC ATG ACG GTG	181
G S L Q A K E C C P P L G A D P A N	50
GGC AGC CTG CAG GCC AAG GAA TGC TGC CCG CCG CTG GGC GCC GAC CCC GCC AAC	235
V C G S R E G R G Q C A E V Q T D T	68
GTC TGC GGC TCC CGG GAG GGC CGG GGC CAG TGC GCG GAG GTG CAG ACC GAC ACC	289
R P W S G P Y V L R N Q D D R E R W	86
AGG CCC TGG AGC GGT CCC TAC GTC CTG CGC AAC CAG GAC GAC CGA GAG CGA TGG	343
P R K F F D R T C R C T G N F A G Y	104
CCC CGG AAG TTC TTC GAC CGG ACC TGC AGG TGC ACA GGA AAC TTC GCC GGC TAT	397
N C G N C R F G W T G P K C D Q K K	122
AAC TGT GGA AAC TGC AGG TTT GGC TGG ACC GGA CCC AAA TGC GAT CAG AAG AAA	451
P L V V R R D V H S L T P Q E R E Q	140
CCA TTG GTT GTC CGG CGA GAT GTC CAT TCC TTG ACC CCT CAA GAG AGG GAG CAA	505
F L D A L D L A K Y T P H P D Y V I	158
TTC TTG GAC GCC TTA GAC CTC GCA AAG TAC ACT CCG CAC CCC GAC TAC GTG ATC	559
T T Q H W L G L L G P N G T Q P Q I	176
ACC ACG CAA CAC TGG CTG GGC CTC CTG GGG CCC AAT GGG ACC CAA CCA CAG ATC	613
A N C S I Y D F F V W L H Y Y S V R	194
GCC AAC TGC AGC ATT TAT GAT TTC TTT GTG TGG CTC CAT TAT TAT TCC GTC AGA	667
D T L L G P G R P Y K A I D F S H Q	212
GAT ACA TTA TTA GGA CCA GGG CGC CCA TAC AAG GCT ATA GAT TTC TCA CAC CAA	721
G P A F V T W H R Y H L L W L E R D	230
GGA CCT GCT TTT GTT ACC TGG CAC CGG TAC CAC TTG TTA TGG CTG GAA AGG GAT	775
L Q R L T G N E S F A L P Y W N F A	248
CTC CAG CGC CTT ACT GGC AAT GAG TCC TTC GCT TTG CCC TAC TGG AAC TTT GCC	829
T G R N E C D V C T D Q L L G A A R	266
ACC GGC AGG AAC GAG TGT GAC GTG TGC ACG GAC CAG CTG CTC GGG GCA GCA AGG	883
Q D D P T L I S Q N S R F S S W E I	284
CAA GAC GAT CCG ACT CTG ATT AGT CAG AAC TCC CGA TTC TCC AGC TGG GAG ATT	937
V C D S L N D Y N R R V T L C N G T	302
GTC TGT GAT AGC TTG AAT GAC TAC AAC CGC CGA GTC ACC TTG TGT AAT GGA ACC	991
Y E G L L K R N Q M G R N S E K L P	320
TAT GAA GGT TTG TTG AAA AGA AAT CAA ATG GGA AGA AAC AGT GAA AAA TTG CCA	1045
T L K D I Q N C L S L K K F D S P P	338
ACT TTA AAA GAC ATA CAA AAT TGC CTG TCT CTC AAG AAG TTT GAC AGT CCT CCT	1099
F F Q N S T L S F R N A L E G F G K	356
TTC TTC CAG AAC TCT ACC CTC AGT TTC AGG AAT GCC CTG GAA GGG TTT GGC AAA	1153

suite page suivante →

A	D	G	T	L	D	S	Q	V	M	N	F	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	374
GCA	GAT	GGG	ACC	CTG	GAC	TCT	CAA	GTG	ATG	AAT	TTT	CAT	AAT	CTG	GTT	CAT	TCC	1207
<u>F</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	392
TTC	CTG	AAT	GGG	ACA	AGC	GCT	TTG	CCA	CAT	TCT	GCT	GCC	AAT	GAT	CCT	GTT	TTT	1261
<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>W</u>	M	K	R	F	410
GTG	GTC	CTT	CAT	TCC	TTC	ACT	GAT	GCC	ATT	TTT	GAC	GAG	TGG	ATG	AAA	AGA	TTC	1315
N	P	P	V	D	A	W	P	R	E	L	A	P	I	G	H	N	R	428
AAT	CCC	CCT	GTG	GAT	GCC	TGG	CCT	CGG	GAG	CTG	GCA	CCC	ATT	GGT	CAC	AAT	CGG	1369
M	Y	N	M	V	P	F	F	P	P	V	T	N	E	E	L	F	L	446
ATG	TAT	AAC	ATG	GTT	CCT	TTC	TTC	CCT	CCG	GTG	ACT	AAT	GAG	GAA	CTC	TTT	TTA	1423
T	A	D	Q	L	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	A	I	D	L	P	V	E	E	T	464
ACC	GCA	GAC	CAA	CTT	GGC	TAC	AGT	TAT	GCC	ATT	GAT	CTG	CCA	GTT	GAA	GAA	ACT	1477
P	D	W	T	T	V	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	482
CCA	GAT	TGG	ACC	ACA	GTG	CTC	TCA	GTG	GTT	ACG	GGG	ATG	CTC	GTG	GTT	TTG	GTT	1531
<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	Q	Y	R	R	L	R	K	G	<u>Y</u>	500
GTC	CTT	TTT	GCA	TTG	CTT	CTT	TTC	CTT	CAA	TAT	AGA	CGA	CTT	CGA	AAA	GGG	TAT	1585
<u>T</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	V	E	T	Q	L	S	N	K	R	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	A	*	518
ACA	CCC	TTA	GTG	GAG	ACA	CAG	CTA	AGC	AAC	AAA	AGA	TAC	ACC	GAA	GAA	GCC	TAG	1639
atgctcacaccttgctctagagaagaggctgaccaaggcatagttctgactgacaacctgcaaatgaacct																		1711
cactgttcttctcttctggtgaagagctttggcatagcccctcctgctatggtgatgatcccaagtatggaag																		1783
atgtgtagaaactctagtttctgatttgcttgtttgtttaacaaacaagctaaagtgcttgagggtatctct																		1855
accatcaaacaaaggtagctgatgacagctggtggtatctgataataatccccatactgattgattaagc																		1927
ctcctcgtgttctgatccccccaaaatcaatacagtggactccctc																		1974

Figure 42 : Structure de l'enzyme DCT bovine.

Exons : bleu et orange ; parties non codantes : minuscules ; parties codantes : majuscules ; signal de polyadénylation : gras ; peptide signal : surlignage bleu ; clusters de cystéines : surlignage jaune ; sites catalytiques : surlignage vert ; domaine transmembranaire : surlignage violet ; motifs importants pour le maintien de la structure globulaire : surlignage gris ; cystéines conservées : rouge ; histidines catalytiques : rouge souligné ; sites potentiels de N-glycosylation : vert ; motifs d'adressage : souligné.

	BOVIN	HUMAIN	MURIN
TYR	530	529 (87%)	533 (82%)
TYRP1	537	537 (89%)	537 (85%)
DCT	517	519 (84%)	517 (83%)

Tableau 7 : Tailles des différentes enzymes et conservation (pourcentages d'identités) entre plusieurs espèces.

TYR <i>bos</i>	<u>MLLAALYCLLWSFRTSAG</u> HFPPRA <u>CASSKSLTEKE</u> <u>CCPPWAGDGS</u> <u>PCGRLSGRGS</u> <u>CQD</u> VIL	60
TYR <i>homo</i>	---V---Q---V---N-M---S---R---Q---N-I-L-	60
TYR <i>mus</i>	-F--V-----Q-I-D-----N-LA-----M-----Q-----I-L-	60
TYR <i>bos</i>	STAPLGPQFPFTGVDDRESWPSIFYNRT <u>CQCFSNFMGFN</u> <u>CGSCKFGFRGPR</u> <u>C</u> TERRLLVR	120
TYR <i>homo</i>	-N-----V-----SG-----N-----W---N-----	120
TYR <i>mus</i>	-S--S-----K-----V-----SG-----N-----G---N---K-V-I-	120
TYR <i>bos</i>	RNIFDLSPVEKNKFLAYLTLAKHTTSPDYVIPTGTYGQMNHGTTPLFNDVSA <u>YDLFVWMH</u>	180
TYR <i>homo</i>	-----A--D--F-----I-S-----I-----KN-S--M---INI-----	180
TYR <i>mus</i>	-----S-----FS-----I-SV---T-----N-S--M---INI-----	180
TYR <i>bos</i>	<u>YYVSRD</u> <u>TL</u> <u>LG</u> <u>DSEVWRD</u> <u>IDFA</u> <u>HEAPGFLPW</u> <u>HRLFLL</u> <u>LWE</u> <u>QEI</u> <u>QKLT</u> <u>GDEN</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>D</u>	240
TYR <i>homo</i>	---M-A--G--I-----A-----R-----	240
TYR <i>mus</i>	-----G--I-----RE-----V-----	240
TYR <i>bos</i>	AEN <u>CDVCT</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>N</u>	300
TYR <i>homo</i>	--K--I-----Q-H-T-----H-S-----P---R--	300
TYR <i>mus</i>	-----I-----L--H-E-----I--S-----H-V--D--P-----	300
TYR <i>bos</i>	PGNHDKARTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFADPVTGIADASQS	360
TYR <i>homo</i>	-----S-----S-L-----P---	360
TYR <i>mus</i>	-----K-----RT-----V--S-L-----P---	360
TYR <i>bos</i>	SM <u>H</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>H</u>	420
TYR <i>homo</i>	-----Q-----RHR--E-----	420
TYR <i>mus</i>	-----F-----Q-----RHR--LE-----	420
TYR <i>bos</i>	NRESYMPVPIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSEPDIFQDYIKPYLEQAQRIPW <u>P</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u>	480
TYR <i>homo</i>	-----D--SF-----S---S---L---	480
TYR <i>mus</i>	--D-----T-----E-D-GFYRN--E---S-----L---	480
TYR <i>bos</i>	<u>AAVGS</u> <u>SVL</u> <u>TAVL</u> <u>GGL</u> <u>TS</u> <u>LL</u> <u>C</u> <u>==</u> <u>RR</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>L</u>	530
TYR <i>homo</i>	--M--A---L-A--V-----H--K-----S==	529
TYR <i>mus</i>	--L--A-IA-A-S--S-R--LQKKK-KK-PQ--R-----D-D---S-L-----	533

Figure 43 : Alignement des séquences peptidiques des TYR bovines, humaines et murines.

Les numéros d'accès sont AAL38168, P14679 et P11344 pour TYR bovine, humaine et murine, respectivement. La méthionine correspondant au codon d'initiation est attribuée au résidu 1. Les identités de séquence et les délétions d'acides aminés sont indiquées respectivement par des tirets et des doubles tirets. Exons : bleu et orange ; parties non codantes : minuscules ; parties codantes : majuscules ; signal de polyadénylation : gras ; peptide signal : surlignage bleu ; clusters de cystéines : surlignage jaune ; sites catalytiques : surlignage vert ; domaine transmembranaire : surlignage violet ; motifs importants pour le maintien de la structure globulaire : surlignage gris ; cystéines conservées : rouge ; histidines catalytiques : rouge souligné ; sites potentiels de N-glycosylation : vert ; motifs d'adressage : souligné ; sérine phosphorylable : rose.

L'analyse des séquences peptidiques codées par les gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* bovins révèle que ces enzymes sont très bien conservées entre les espèces, tant au niveau de leur taille globale que de leurs séquences (Tableau 7). La masse théorique est de 60,2, 60,6 et 58,7 kDa respectivement pour *TYR*, *TYRP1* et *DCT*.

L'analyse fine des séquences peptidiques montre une très bonne conservation de tous les éléments caractéristiques de ces enzymes, du peptide signal aux séquences d'adressage en C-terminal (Figure 43, Figure 44 et Figure 45).

TYRP1	<i>bos</i>	MKSPTLLSLGYMFLVLLFFQQAWAQFPRECATIEALRNGVCCPDLSPLSGPGSDRCGLSS	60
TYRP1	<i>homo</i>	-SAPK-----CI-FP--L----R-----Q---V---S-M-----V----T---S--	60
TYRP1	<i>mus</i>	---YNV-P-AYIS-F-ML-Y-V-----NI---R-V-----L-S---T-P--S--	60
TYRP1	<i>bos</i>	GRGRCEVVIADSRPHSHHYPHDGRDDREGWPTRSFNRTCHCNGNFSGHNCGTCRPGWGGA	120
TYRP1	<i>homo</i>	-----A-T-----PQ-----V--L-F-----R--	120
TYRP1	<i>mus</i>	-----VA-----R-----K---A--L-F-----Q--D-----R--	120
TYRP1	<i>bos</i>	ACDQRVLTVRRNLLDLSTEEKNRFVRAALDMAKRTTHPQFVIATRRESEILGPDGNTQPQFE	180
TYRP1	<i>homo</i>	-----I-----K---H-----L-----	180
TYRP1	<i>mus</i>	--N-KI-----P--SH-----L-D-----	180
TYRP1	<i>bos</i>	NISIIYNYFVWTHYYYSVKKTFGLGAGQESFGEVDFSHEGPAFLTWHRYHLLQLERDMQEMLQ	240
TYRP1	<i>homo</i>	-----V-----V-----R--K-----	240
TYRP1	<i>mus</i>	---V-----T-----D-----	240
TYRP1	<i>bos</i>	DPSFSLPYWNFATGKNTCDICTDDLMGSRSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCESLEDYDTLGC	300
TYRP1	<i>homo</i>	E-----V-----D-----	300
TYRP1	<i>mus</i>	E-----V-V-----E-----	300
TYRP1	<i>bos</i>	TLCNSTEGGPIKRNPAAGNVARPMVQRLPKPQDVAQCLEVGSYDTPPFYSNSTNSFRNTVE	360
TYRP1	<i>homo</i>	-----D---R-----E-----LF-----	360
TYRP1	<i>mus</i>	-----R-----G--A---E---T---RVF-----D-----	360
TYRP1	<i>bos</i>	GYSHTPGRYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNA	420
TYRP1	<i>homo</i>	---D---K-----	420
TYRP1	<i>mus</i>	---A---K-----	420
TYRP1	<i>bos</i>	DISTYPLENAPIGHNROYNMVPFPPVTNIEMFVTAPDNLGYTYEVQWPSRSFSISEIVT	480
TYRP1	<i>homo</i>	---F-----T-----I-----E--VP--IA	480
TYRP1	<i>mus</i>	---F-----T-----A-----GQE-TV---I-	480
TYRP1	<i>bos</i>	IAVVAALSLVAVIFAGASCLIRARSNMDEANQPLLTDQYQHYIEEYEKIHNPNQSVV	537
TYRP1	<i>homo</i>	---G--L--L--GT--Y---RS---C-A---LQ-----	537
TYRP1	<i>mus</i>	-----L--A--GV-----S-STKN-----H--R-A-D--ELP---H-M-	537

Figure 44 : Alignement des séquences peptidiques des TYRP1 bovines, humaines et murines.

Les numéros d'accès sont AAL38167, P17643 et P07147 pour TYRP1 bovine, humaine et murine, respectivement. Exons : bleu et orange ; parties non codantes : minuscules ; parties codantes : majuscules ; signal de polyadénylation : gras ; peptide signal : surlignage bleu ; clusters de cystéines : surlignage jaune ; sites catalytiques : surlignage vert ; domaine transmembranaire : surlignage violet ; motifs importants pour le maintien de la structure globulaire : surlignage gris ; cystéines conservées : rouge ; histidines catalytiques : rouge souligné ; sites potentiels de N-glycosylation : vert ; motifs d'adressage : souligné ; motif reconnu par les protéines à domaine PDZ : double souligné.

DCT	<i>bos</i>	MSPLGWGLLLGCLGCALPSGARA QFPRV CMTVGS LQAKE CCPPLGADPANVCGSREGRGQ	60
DCT	<i>homo</i>	---W--F--S---KILP--QG-----D--VN-----R---ES-----QQ----	60
DCT	<i>mus</i>	-GLV-----GILLR-----LDGVLN-----PEAT-I--FL-----	60
DCT	<i>bos</i>	CAEVQTDTRPWSG PYVLRNQDDRERWPRKFFDRT CRCTGNFAGY NC GNCRFGWTGPKCDO	120
DCT	<i>homo</i>	-T--RA-----I-----L-----H--K-----D-K-----N-ER	120
DCT	<i>mus</i>	-----I-----Q-----N--K-----G-K-----D-NR	120
DCT	<i>bos</i>	KKPLVVRRDVHSLTPQEREQFLDALDLAKYTPHPDYVITTOHWLGLLGP NGTQPQIANCS	180
DCT	<i>homo</i>	---P-I-QNI---SP-----G-----KRV-----F----	180
DCT	<i>mus</i>	---AIL--NI---A-----G-----KSI-----	180
DCT	<i>bos</i>	IYDFFVWL HYYSVRD TLLGPGRPYKAIDFS HQGP AFVTW HRYHLLWLERDLQRLTG NESF	240
DCT	<i>homo</i>	V-----R-----C-----I----	240
DCT	<i>mus</i>	V-----E-----	240
DCT	<i>bos</i>	ALPYWN FATGRNECDVCTDQLLGAARQDDPTLISQNSRFSSWEIVCDSLNDYNRRVTL CN	300
DCT	<i>homo</i>	-----F-----P-----R-----T-----D---HL----	300
DCT	<i>mus</i>	-----K-----DW-----R-----T-----D-----	300
DCT	<i>bos</i>	GTYEGLLKR NQMG RNSEKLP TLKDIQ NCLSLKKFDSPPFF QNSTLSFRNALEGFGKADGT	360
DCT	<i>homo</i>	-----R-----M-----RD---Q---N-----F-----D-----	360
DCT	<i>mus</i>	-----R--KV---N---NV-D---Q---F-----D-----	360
DCT	<i>bos</i>	LDSQVMNF HNLVHSFL NGTSALPHSAANDPVF VVLHSFTDAIFDEWMKRFNPPVDAWPRE	420
DCT	<i>homo</i>	-----SL---V---N-----I-----M--F--PA---O-	420
DCT	<i>mus</i>	-----NL--A-----N-----V-----L--N--ST---Q-	420
DCT	<i>bos</i>	LAPIGHNRMYNMVFFPPVTNEELFL TADQLGYSYAIDLP==VEETPDWTTVLSVVTGML	478
DCT	<i>homo</i>	-----S-----VS-----G-P-T-L--M-T-	480
DCT	<i>mus</i>	-----E---N--V--S==E--A-V-S-T---I-I-	478
DCT	<i>bos</i>	VVLVVL FALL LFLQYRRLR KGY TPLVETQ LSNKRY TEEA	517
DCT	<i>homo</i>	-A--G--V--A-----M--H--S-----	519
DCT	<i>mus</i>	GAF-L-LG--A-----A--M--G--S-----	517

Figure 45 : Alignement des séquences peptidiques des DCT bovines, humaines et murines.

Les numéros d'accès sont AAP33051, P40126 et P29812 pour DCT bovine, humaine et murine, respectivement. Exons : bleu et orange ; parties non codantes : minuscules ; parties codantes : majuscules ; signal de polyadénylation : gras ; peptide signal : surlignage bleu ; clusters de cystéines : surlignage jaune ; sites catalytiques : surlignage vert ; domaine transmembranaire : surlignage violet ; motifs importants pour le maintien de la structure globulaire : surlignage gris ; cystéines conservées : rouge ; histidines catalytiques : rouge souligné ; sites potentiels de N-glycosylation : vert ; motifs d'adressage : souligné.

	Race	Mutation	Effet
TYR	Montbéliarde Gasconne	A318G	Silencieuse
	Prim'Holstein Limousine	G764S	A234P
	Montbéliarde	C770Y	P236L
	Gasconne	T1026C	Silencieuse
	Prim'Holstein Gasconne	C1458Y	Silencieuse
TYRP1	Charolais Salers	A1039R	L312E
	Charolaise	G1056K	Silencieuse

Tableau 8 : Polymorphismes observés chez les bovins.

S : G ou C ; R : A ou G ; K : T ou G ; Y : C ou T.

II. Etude du polymorphisme des gènes de la famille tyrosinase

Les races Prim'Holstein, Charolaise, Limousine, Gasconne, Salers, Montbéliarde et Maine Anjou ont été étudiées pour rechercher d'éventuels polymorphismes dans la partie codante des gènes *TYR* et *DCT*. La partie codante du gène *TYRPI* a été aussi étudiée chez les races Prim'Holstein, Charolaise et Gasconne. Dans un premier temps, nous avons décidé d'analyser trois individus de chaque race. Ce nombre peut paraître faible pour une étude de polymorphisme mais notre but est de déterminer si des mutations dans les gènes de la famille tyrosinase permettent d'expliquer le phénotype des robes bovines. De telles mutations causales doivent donc être présentes chez tous les individus d'une même race. Ce nombre limité d'individu permet de faire un premier criblage des positions intéressantes et, le cas échéant, le nombre d'animaux étudiés peut être augmenté.

Les résultats obtenus montrent que *TYR* et *TYRPI* sont polymorphes, alors que *DCT* semble plus invariant (Tableau 8). Parmi les mutations observées, on constate que la moitié est silencieuse et que l'autre partie conduit à des changements d'acides aminés. Cependant, aucun de ces polymorphismes n'est spécifique d'une race donnée, c'est-à-dire, par exemple, que la mutation G764S observée chez un individu Limousin n'est pas présente chez tous les individus Limousins testés. Ainsi, ce polymorphisme ne peut être responsable de la coloration froment propre à la race Limousine. La même observation peut être faite sur les autres mutations détectées.

Le patron de coloration des races bovines observées ne semble donc pas être dû à des mutations modifiant l'activité des enzymes de la famille tyrosinase. Ceci étant, on ne peut exclure la présence de mutations causales dans les régions non codantes de ces gènes. Par exemple, des mutations dans les promoteurs ou les introns pourraient conduire à des régulations transcriptionnelles différentes suivant les races.

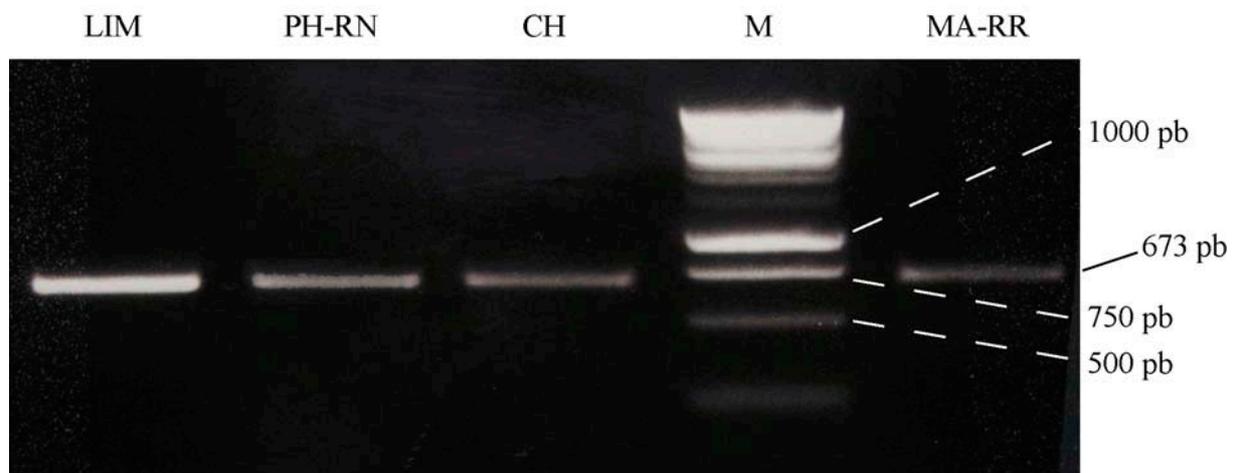


Figure 46 : Amplification de la partie codante du gène *RAB38* bovin chez différentes races bovines.

LIM : Limousine ; PH-RN : Prim'Holstein région noire ; CH : Charolaise ; MA-RR : Maine-Anjou région rouge ; M : marqueur de poids moléculaire.

III. Etude du gène *RAB38* bovin

N'ayant pas détecté de mutations causales dans les gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* permettant d'expliquer les différences de colorations observées, nous avons émis l'hypothèse que des défauts dans l'adressage de ces enzymes au mélanosome pourraient être en cause.

Le gène *Rab38* murin a été impliqué dans l'établissement du phénotype *chocolate* caractérisé par une coloration marron du pelage. Rab38 est une GTPase Binding Protein. Comme l'a montré Loftus et ses collaborateurs, cette protéine est uniquement impliquée dans le transport de Tyrp1 vers le mélanosome (Loftus *et al.*, 2002). Le phénotype *chocolate* rappelant le patron phéomélanique de races comme la Limousine ou la Maine-Anjou, nous avons décidé d'étudier le polymorphisme de *RAB38* bovin chez ces races. Les races Prim'Holstein et Charolaise ont également été incluses dans cette étude.

A. Clonage

1) Définition des oligonucléotides

Un oligonucléotide a été défini en 5' (*RAB38-5'*) grâce aux séquences d'EST bovines trouvées dans la banque de données Genbank par le programme BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Un oligonucléotide a été défini en 3' (*RAB38-3'*) dans une région d'homologie entre l'Homme (NM_022337) et la souris (AY062237) identifiée grâce au programme CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Ces deux amorces permettent d'amplifier la partie codante du gène *RAB38*.

2) Amplification et séquençage de la partie codante du gène *RAB38*

La partie codante du gène *RAB38* bovin a été amplifiée sur les races Limousine, Prim'Holstein (région noire), Charolaise et Maine-Anjou (région rouge) (Figure 46). On obtient un amplifiat de taille attendue (673 pb).

Après séquençage, on constate que ce gène code une protéine de 174 AA (Figure 47) pour un poids moléculaire théorique de 23,7 kDa. Cette protéine est également une GTPase comme l'atteste l'homologie trouvée par le programme BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) avec le domaine KOG4423.

La comparaison de l'enzyme bovine avec son homologue humaine révèle que RAB38 est extrêmement conservée avec 98% d'identité entre ces deux espèces (Figure 48).

La structure génomique déduite grâce au programme Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>) montre une organisation identique à celle de l'Homme en trois exons tous codants. N'ayant pas eu à rechercher les séquences UTR de ce gène pour cette étude (voir §1 ci-dessus), la séquence nucléotidique ne présente pas la totalité de la séquence de l'ADNc du gène RAB38.

```

RAB38bos      MQVPHKEHLYKLLVIGDLGVGKTSIIKRYVHQNFSSHYRATIGVDFALKVLHWDPEVTVR 60
RAB38homo     --A----- 60

RAB38bos      LQLWDIAGQERFGNMTRVYYREAMGAFIVFDVTRPATFEAVTKWKNLDSKLSLPLNGKPV 120
RAB38homo     -----A----- 120

RAB38bos      SVVLLANKCDQKGDVLLNNGLKMDQFCKEHGFVGFWFETSAKENINIDEASRCLVKHILAN 180
RAB38homo     -----M----- 180

RAB38bos      ECDLMESIQPDIVKPHLTSTKVASCSCGCAKS 211
RAB38homo     -----E-V----- 211

```

Figure 48 : Comparaison de séquences entre les protéines RAB38 bovines et humaines.

B. Etude du polymorphisme du gène *RAB38* bovin

La partie codante du gène *RAB38* a été amplifiée et séquencée chez les races Limousine, Prim'Holstein, Charolaise et Maine-Anjou. La comparaison des séquences obtenues n'a révélé aucun polymorphisme de séquence entre ces races.

Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que le phénotype de la robe de ces races n'est pas déterminé par un défaut de transport de TYRP1 lié à une mutation dans le gène *RAB38*. Comme dans le cas des études de polymorphisme sur *TYR*, *TYRP1* et *DCT*, on ne peut exclure la présence de polymorphisme dans les régions non codantes de ce gène.

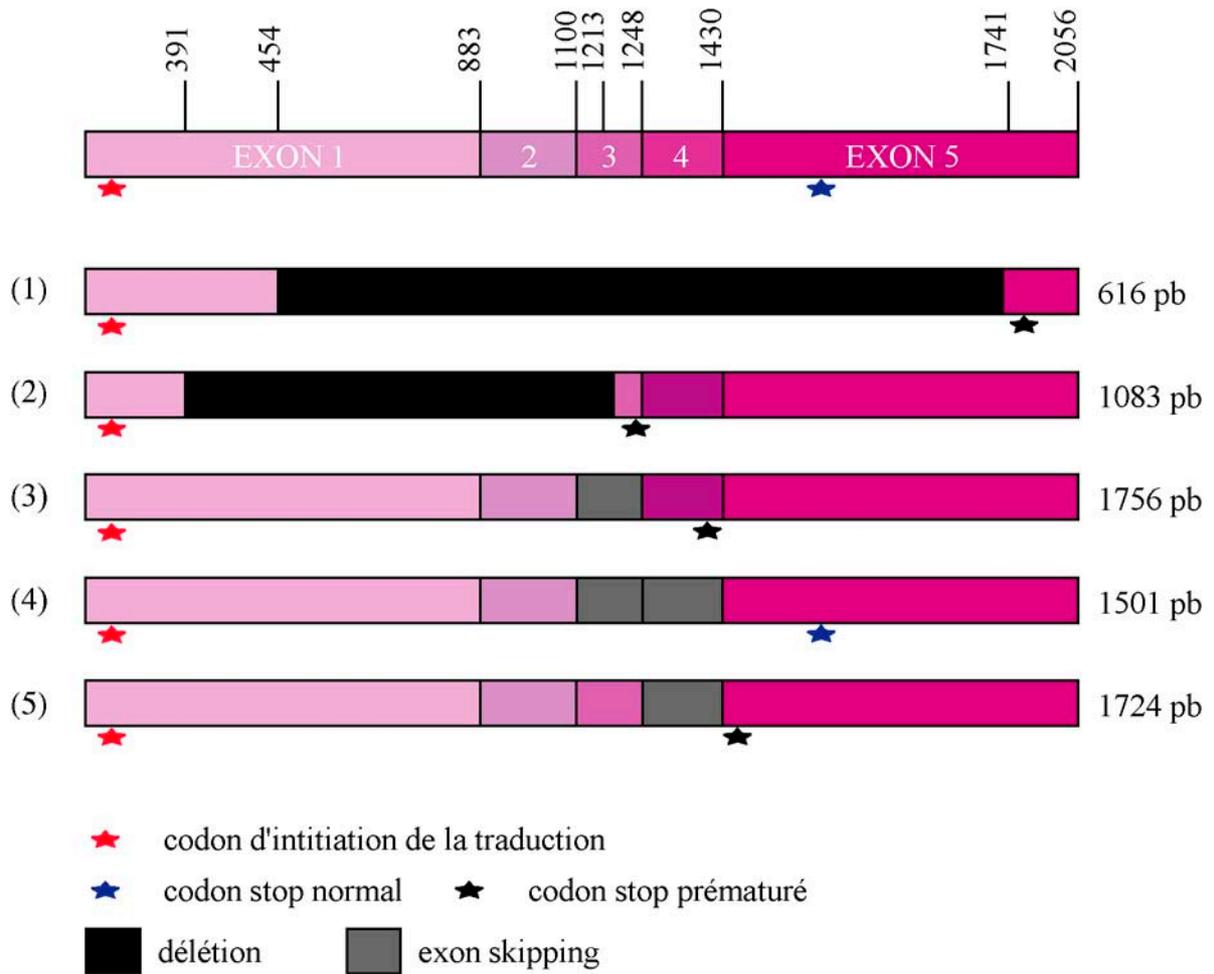


Figure 49 : Transcrits alternatifs du gène *TYR* isolés chez différentes races bovines.

IV. Etude de la régulation transcriptionnelle des gènes de la famille tyrosinase

On a vu jusqu'à présent qu'aucun variant des enzymes bovines de la famille tyrosinase ne permettait d'expliquer les différences de coloration entre les races étudiées. Un défaut de transport de TYRP1 ne semble pas non plus impliqué. Dans ce contexte, des niveaux d'expression différents pourraient expliquer les différences phénotypiques observées. Aussi, nous avons entrepris l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes de la famille tyrosinase.

A. Caractérisation de transcrits alternatifs du gène *TYR*

Lors de l'étude des transcrits du gène *TYR*, un certain nombre de transcrits alternatifs ont été caractérisés chez les races Limousine, Charolaise et Salers (Figure 49).

Ces transcrits peuvent avoir pour origine soit de larges délétions commençant dans l'exon 1 (type 1 et 2) soit de l'exon skipping des exons 3 ou 4 ou les deux (type 3, 4 et 5). Les protéines potentiellement codées par de tels transcrits sont tronquées et se terminent généralement par un codon stop prématuré. Seul l'exon skipping des exons 3 et 4 (type 4) permet une reprise de la traduction dans la phase normale et ainsi permettrait à la protéine codée de posséder une queue C-terminale normale.

Ces protéines, si elles existent, pourraient jouer un rôle de régulation de la mélanogénèse, par exemple en séquestrant le substrat tyrosine. Quel que soit leur rôle, seule la protéine codée par le type 4 possède en C-terminal les éléments d'adressage au mélanosome. Cette protéine pourrait alors se complexer aux tyrosinases normales et les inhiber.

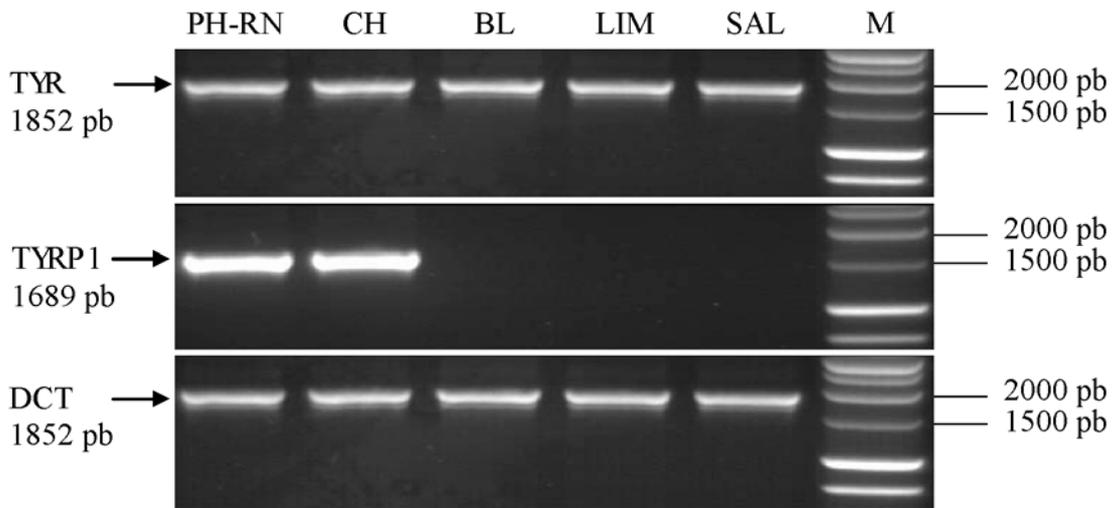


Figure 50 : Expression différentielle des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* chez différentes races bovines.

PH-RN : Prim'Holstein région noire, CH : Charolaise, BL : Blonde d'Aquitaine, LIM : Limousine, SAL : Salers.
Les tailles des amplifiats obtenus sont indiquées. M : marqueur de poids moléculaire.

B. Etude de l'expression des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT* par PCR

La régulation transcriptionnelle a d'abord été étudiée sous un angle présence/absence par amplification des transcrits chez différentes races. Les amorces utilisées sont celles permettant l'amplification de la partie codante. L'expérience a été réalisée sur des ADNc de Prim'Holstein, Charolais, Blonde d'Aquitaine, Limousin et Salers. On observe des amplifiats de taille attendue pour toutes les amplifications. *TYR* et *DCT* sont exprimés dans toutes les races alors que l'expression de *TYRPI* semble être soumise à une régulation différentielle conduisant à sa sous-expression totale chez la Blonde d'Aquitaine, la Limousine et la Salers (Figure 50).

C. Etude de l'expression des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT* par RT-PCR semi-quantitative chez différentes races bovines

Afin d'affiner ces mesures d'expression, nous avons entrepris une démarche de RT-PCR semi-quantitative. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication présentée en Annexe.

1) Définition des amorces

Les couples d'amorces utilisés en RT-PCR semi-quantitative doivent répondre à un certain nombre d'exigences. La longueur et le T_m optimum de celles-ci sont de 20 bases et 59°C, respectivement. Les possibilités de repliement des amorces sur elles-mêmes et d'appariement entre elles doivent aussi être contrôlées. Tous ces paramètres sont intégrés dans le programme PrimerExpress™ qui nous a permis de déterminer des couples d'amorces optimaux. Les amorces ainsi définies sont listées dans le Tableau 5 (Matériels et Méthodes, chapitre I.IV.D) et sont nommées *-QT1 et *-QT2, où * représente le nom du gène.

2) Niveaux d'expression chez différentes races

Différents échantillons de peau ont été prélevés chez les races Limousine, Charolaise, Maine-Anjou, Salers, Montbéliarde et Blonde d'Aquitaine (*e/e*) ainsi que chez les races Prim/Holstein (E^D/E^D) et Gasconne (E^+/E^+ , E^l/E^l , E^+/E^l). Le niveau d'expression des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT* a été mesuré par RT-PCR semi quantitative. Les calculs se font comparativement à une référence, la partie noire de la Prim'Holstein, qui représente alors un

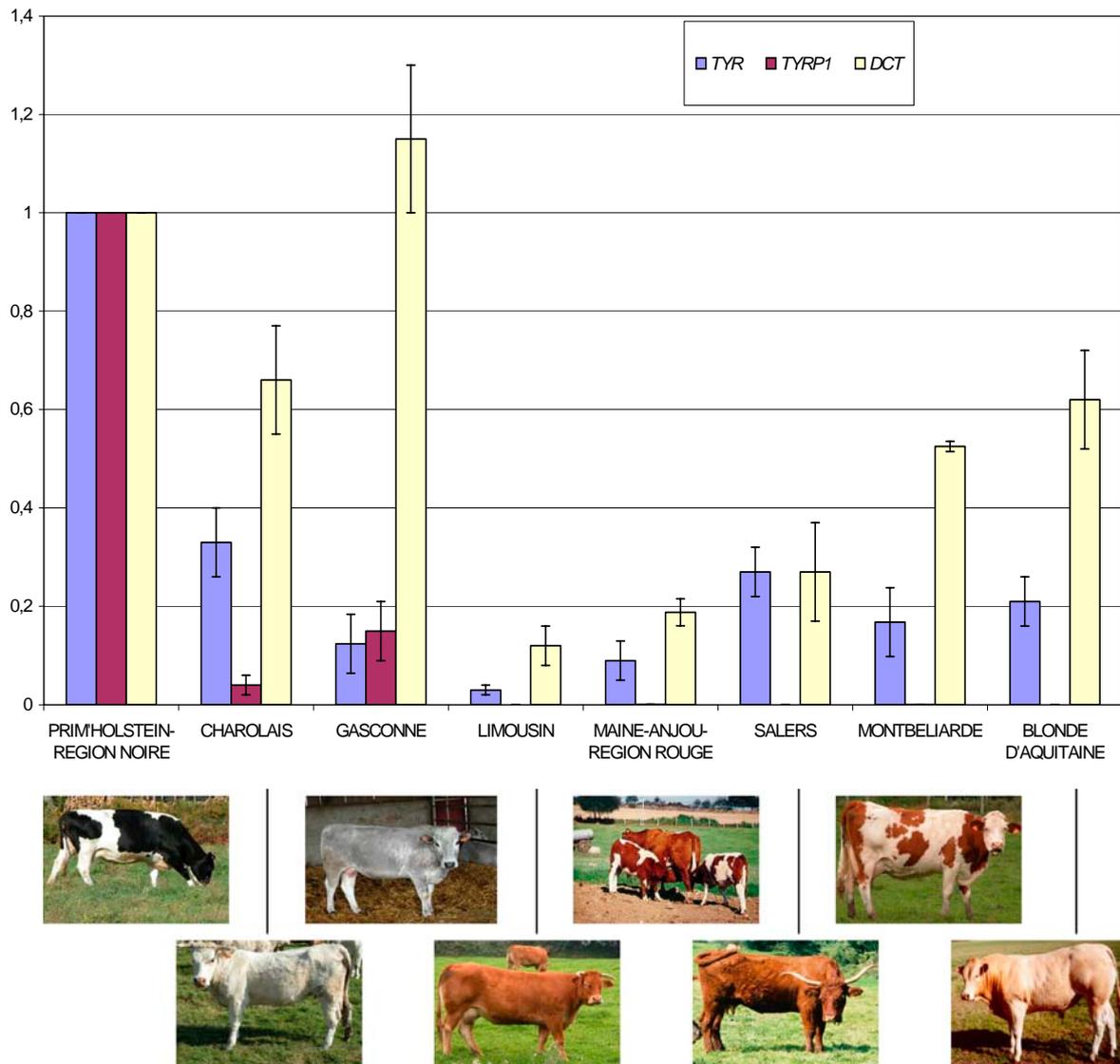


Figure 51 : Niveau d'expression des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* chez différentes races bovines.

taux d'expression de 1 pour tous les gènes. Cet échantillon est pris en référence car nous considérons qu'il représente un niveau d'expression maximale des trois gènes de la famille tyrosinase. Il est important de noter que même si l'expression des trois gènes est présentée sur un seul graphe, il est absolument incorrect de comparer l'expression de gènes différents entre les races ou pour une même race.

Globalement, on observe que les niveaux d'expression des trois gènes sont variables entre les races (Figure 51). Quelle que soit la couleur de la robe (eumélanique ou pheomélanique), *TYR* est exprimé dans la peau de toutes les races. Comme attendu, l'expression la plus forte est observée pour la partie noire de la Prim'Holstein. Dans la peau des autres races, *TYR* est sous-exprimé dans une proportion variable allant de 0,33 pour le Charolais à 0,03 pour la Limousine.

La plus forte expression de *TYRPI* est observée pour la partie noire de la Prim'Holstein et reste indétectable chez les animaux phéomélaniques (Limousine, Maine-Anjou, Salers, Montbéliarde et Blonde d'Aquitaine). De façon inattendue, une légère expression du transcrit *TYRPI* (0,04) est constatée dans la peau du Charolais.

Contrairement à *TYRPI*, des transcrits *DCT* sont détectés dans la peau de toutes les races. Une nouvelle fois, l'expression maximale est observée pour la partie noire de la Prim'Holstein. L'expression de *DCT* est significativement sous-régulée chez la Limousine (0,12), la Maine-Anjou (0,19) et la Salers (0,27) alors que les niveaux chez le Charolais (0,62) et la Blonde d'Aquitaine (0,62) sont au-dessus du seuil de 0,5 (Figure 51).

On observe ainsi, par RT-PCR semi-quantitative, que les trois gènes de la famille tyrosinase s'expriment de manière variable entre les races. *TYRPI* en particulier ne semble pas être exprimée chez les bovins à robes phéomélaniques comme la Blonde d'Aquitaine, la Limousine, la Maine-Anjou, la Montbéliarde et la Salers. Cependant, l'absence complète d'expression de *TYRPI* n'est pas suffisante pour expliquer la dilution des couleurs allant du marron foncé (Salers) au blond (Blonde d'Aquitaine) en passant par le froment (Limousine). Par ailleurs, on n'observe pas de corrélation directe entre le niveau d'expression de *TYR* et *DCT* et la couleur de la robe. Par exemple, le niveau d'expression de *DCT* chez la Salers est inférieur à celui de la Blonde d'Aquitaine qui est pourtant moins pigmentée. Cependant, ces données de niveau d'expression transcriptionnelle ne prennent pas en compte des différences d'efficacité traductionnelle de ces messagers qui pourraient exister entre les différentes races.

Un des points communs entre ces races est leur génotype *e/e* au locus *EXTENSION*. Le génotype *e/e* conduit à la synthèse d'un récepteur tronqué, insensible à l' α -MSH et à Agouti, donc incapable de transmettre un signal. Ainsi, le génotype *e/e* est associé à la sous-régulation des gènes de la famille tyrosinase et par conséquent, est responsable des robes phéomélaniques (Kobayashi *et al.*, 1995). Ces résultats montrent que la relation entre l'expression des gènes bovins de la famille tyrosinase et la signalisation par MC1R, associée aux allèles *e* (perte de fonction) ou *E^D* (gain de fonction) et au final au type de mélanine produite, est similaire aux données rapportées concernant les génotypes *e/e* ou *E^{so}/E^{so}* murins (Robbins *et al.*, 1993). Cette corrélation entre le niveau d'expression de *TYRP1* et le génotype au locus *EXTENSION* suggère que la présence du récepteur tronqué MC1R^e aurait un impact plus drastique sur la régulation de *TYRP1* que sur les autres gènes de la famille *TYR* et *DCT*.

De plus, la coloration plus foncée (eumélanique) observée chez les races exprimant *TYRP1* pourrait indiquer que chez le bovin, à l'instar de la souris, TYRP1 ne serait indispensable qu'à l'eumélanogénèse (Kobayashi *et al.*, 1995). A cet égard, la sous-expression des gènes *TYR* et *TYRP1* chez la Gasconne expliquerait le phénotype gris de cette race. Cette sous-régulation intervient dans le contexte d'allèles sauvages (*E⁺*) ou tout du moins fonctionnels (*E^l*). Par conséquent, l'allèle responsable du phénotype gris de cette race reste à déterminer.

Dans le cas particulier du Charolais, le paradoxe entre le niveau relativement élevé d'expression des gènes de la famille tyrosinase et le phénotype crémeux observé confirme le rôle de la mutation dans le gène *SILVER* identifiée par notre équipe chez cette race et qui conduit à une dilution de la robe phéomélanique (brevet n°03/09/161 ; « Utilisation du gène *SILVER* pour l'authentification de l'origine raciale des populations animales et de leurs produits dérivés » ; INRA/Université de Limoges). Le produit du gène *SILVER* est indispensable pour la maturation du mélanosome. La mutation que possède le Charolais est épistasique sur l'activité des gènes de la famille tyrosinase. Elle serait même liée à la dérégulation de l'expression des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* chez cette race, association qui reste néanmoins à démontrer.

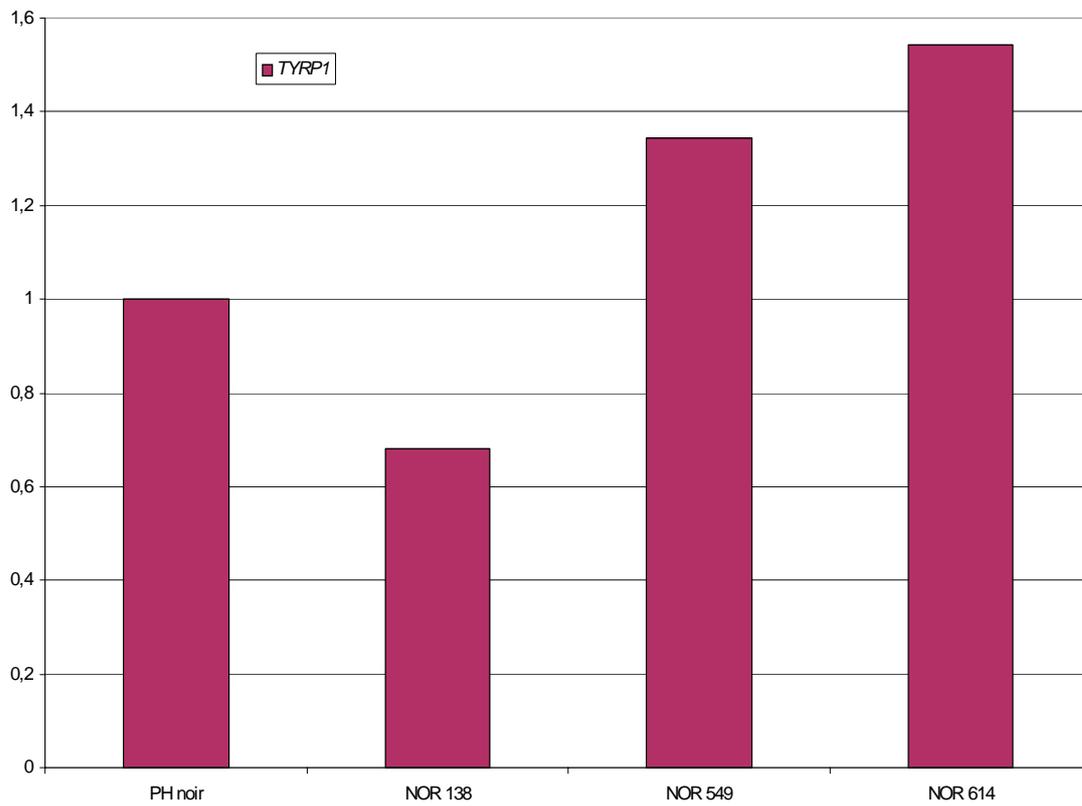


Figure 52 : Niveau d'expression du gène *TYRP1* chez trois individus de la race Normande.

PH noir : Prim'Holstein partie noire ; NOR 138, NOR 549, NOR 614 : individus Normands n°138, 549 et 614.

D. Etude de l'expression des gènes *TYR*, *TYRP1*, *DCT* et *AGOUTI* par RT-PCR semi-quantitative chez la race Normande

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

1) Etude préliminaire

Suite à ces données, il semblait assez évident que des niveaux d'expression de *TYRP1* conditionneraient l'établissement de la bringeure de la race Normande. Nous avons choisi d'étudier pour une première approche l'expression du gène *TYRP1*. Nous avons étudié l'expression de *TYRP1* chez trois individus Normands présentant des robes plus ou moins foncées, c'est-à-dire avec une présence plus ou moins marquée de poils noirs dans la bringeure. L'intérêt d'étudier des Normandes est que la robe des individus de cette race présente des zones plus ou moins foncées suivant les individus et les régions de l'animal.

Les résultats obtenus en RT-PCR semi-quantitative (Figure 52) montrent que l'expression de *TYRP1* est corrélée à la quantité de pigments noirs (eumélaniques) présents dans la peau. Le niveau d'expression se situe à 0,68 pour la plus claire (NOR 138), 1,34 pour l'intermédiaire (NOR 549) et 1,54 pour la plus foncée (NOR 614) par rapport au niveau d'expression fixé à 1 pour la Prim'Holstein.

Au vu de ces résultats, il nous a paru intéressant de compléter cette étude par l'analyse du taux d'expression des trois gènes de la famille tyrosinase un échantillonnage de robes de couleurs variées de la race Normande.

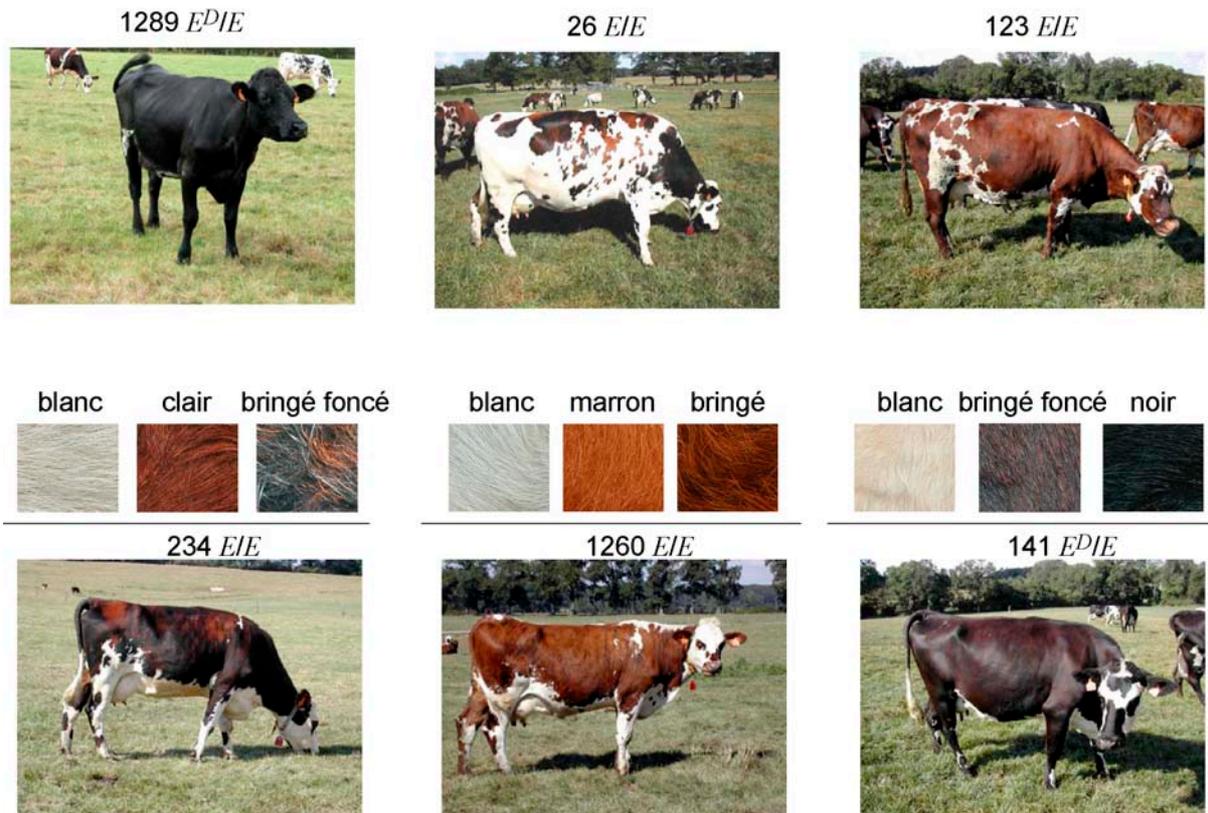


Figure 53 : Individus croisés Prim'Holstein/Normande utilisés pour l'analyse en RT-PCR semi-quantitative.

2) Etude approfondie

Afin d'affiner les résultats de l'étude préliminaire, une étude plus large a été réalisée sur un nombre d'individus plus important. Les animaux utilisés sont des femelles F2 issues d'un croisement Prim'Holstein/Normande provenant de l'élevage expérimental du Domaine du Haras du Pin. L'intérêt de ces vaches croisées est qu'elles possèdent des patrons de coloration variés (Figure 53). La qualification des échantillons, établie de façon subjective, dépend de la proportion de poils noirs sur le fond rouge. Ainsi, on trouve dans l'ordre les parties appelées marron, clair (bringeure légère), bringé et bringé foncé (bringeure soutenue, presque noir). De plus, la génération F2 est homozygote ou hétérozygote pour les allèles E^D et E au locus *EXTENSION*. Ces individus ont donc été génotypés au locus *EXTENSION*. On constate que les individus étudiés sont soit hétérozygotes E^D/E , soit homozygotes E/E . L'absence d'homozygotes E^D/E^D s'explique par l'exclusion délibérée de vaches complètement noires lors du choix des échantillons. En effet, le génotype E^D/E^D induit un phénotype noir peu intéressant dans le cadre de cette étude.

Plusieurs tâches de couleurs différentes ont été prélevées sur ces animaux et analysées en RT-PCR semi-quantitative. Les résultats obtenus montrent eux aussi des niveaux variables de l'expression des gènes de la famille tyrosinase (Figure 54).

D'une façon générale, les parties blanches possèdent uniquement une faible expression de *DCT*. On peut donc en déduire la présence de cellules de la lignée mélanoblastique dans les parties blanches. L'apparition de tâches blanches ne serait donc pas due à un défaut de migration des mélanoblastes (comme dans le cas de la mutation *Kit* (Fleischman, 1992)) mais plutôt à un problème de maturation des mélanoblastes en mélanocytes. Ensuite, les niveaux augmentent pour un même individu avec l'intensité de la coloration. Plus il y a de poils noirs présents dans le pelage (plus d'eumélanine), plus l'expression des trois gènes est forte. Cette expression peut même être supérieure à celle observée chez la Prim'Holstein pour *TYR* et *DCT*. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la stimulation de la voie de signalisation dépendante de MC1R serait inférieure dans le cas de l'allèle constitutivement actif E^D par rapport à l'allèle sauvage E stimulé par l' α -MSH.

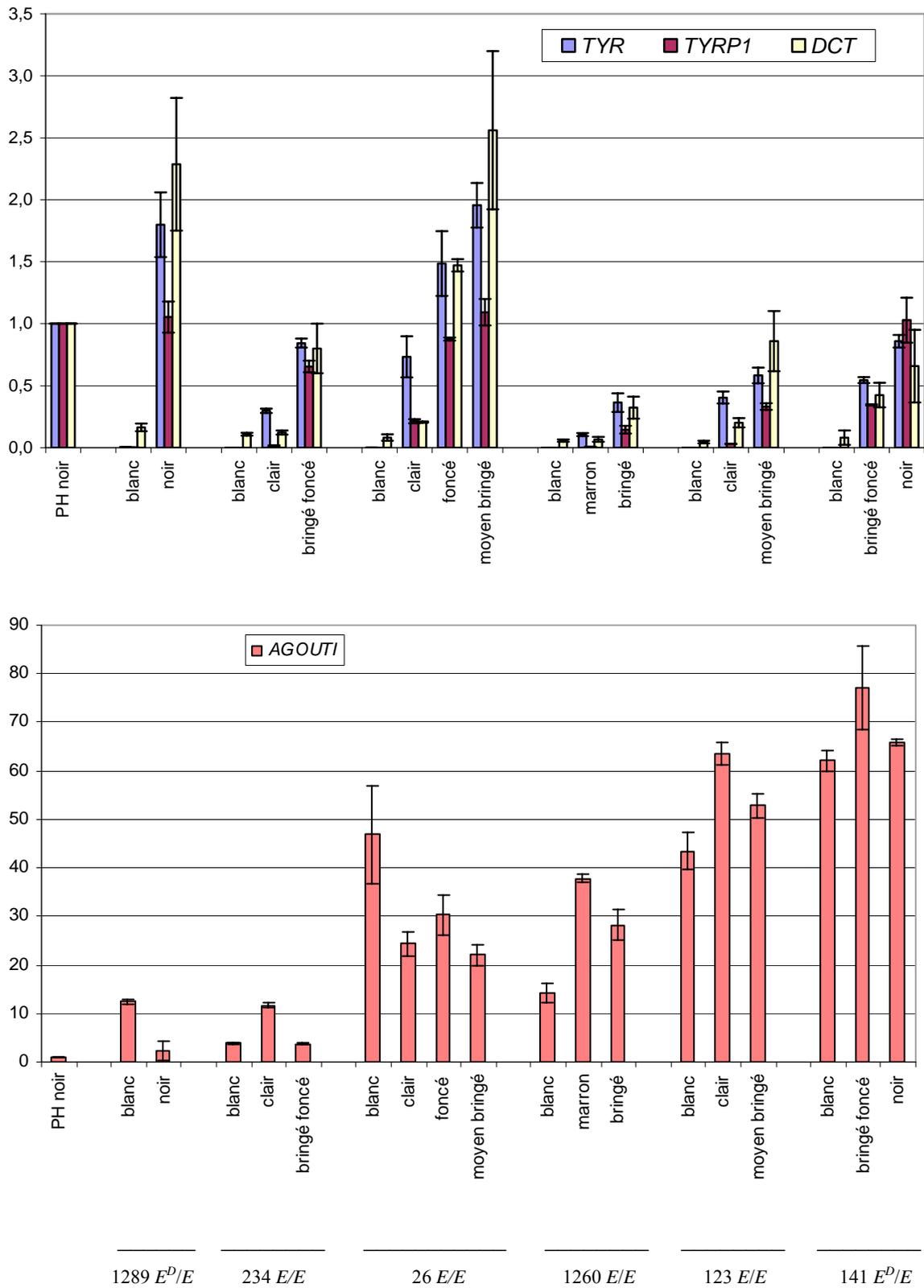


Figure 54 : Niveau d'expression des gènes *TYR*, *TYRP1*, *DCT* et *AGOUTI* dans différentes parties colorées d'individus croisés Prim'Holstein/Normande.

Le ratio eumélanine/pheomélanine étant directement contrôlé par *Extension* et *Agouti* chez la souris sauvage, il est intéressant d'inclure les résultats obtenus par Michael Girardot concernant le gène *AGOUTI* (Figure 54). En effet, la bringeure caractéristique de la Normande ressemble au mosaïcisme de souris apparues lors d'une étude de l'allèle A^{VY} du gène *Agouti* chez la souris (Morgan *et al.*, 1999).

Pour le gène *AGOUTI*, on observe une expression beaucoup plus élevée chez les croisés que chez la Prim'Holstein, quels que soient les individus. Mises à part les parties blanches, on observe que le niveau d'*AGOUTI* est inversement proportionnel à la quantité d'eumélanine présent dans l'échantillon.

Le fait le plus marquant est la corrélation inverse entre l'expression d'*AGOUTI* et le niveau d'expression des gènes de la famille tyrosinase (Figure 54). Pour résumer, on peut dire que plus l'échantillon est eumélanique, moins il y a d'expression d'*AGOUTI* et plus il y a d'expression des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT*.

De ces données, on peut émettre l'hypothèse que la race Normande possède un allèle *AGOUTI* différent de celui que possède la Prim'Holstein. Cet allèle serait soumis à une régulation différente et permettrait une expression basale d'*AGOUTI* (visible dans les parties blanches) beaucoup plus importante que dans la Prim'Holstein. La sur-expression dans les parties colorées pourrait alors provenir d'une régulation de l'expression de ce gène dans ces zones, par un phénomène épigénétique éventuellement. Selon cette hypothèse, les individus 123 et 141 seraient homozygotes pour l'allèle *AGOUTI* Normand, les individus 26 et 1260 seraient hétérozygotes et les individus 1289 et 234 homozygotes pour l'allèle *AGOUTI* Prim'Holstein. L'expression d'*AGOUTI* aurait donc un effet sur la pigmentation des bovins via la régulation négative des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT*, comme on observe chez la souris (Furumura *et al.*, 1996).

Au vu de ces données on peut donc dire que le locus *Brindle* correspondrait au locus *AGOUTI*. L'hypothèse selon laquelle l'allèle *Br* serait responsable de la bringeure deviendrait alors un nouvel allèle du gène *AGOUTI* bovin, noté ici A^{Br} . Il serait à l'état homozygote A^{Br}/A^{Br} chez la Normande. Du fait du génotype E^+/E^+ de la Normande, A^{Br} permet l'établissement d'un phénotype bringé, alors que chez les races Hereford et Red Angus, l'effet de cet allèle serait masqué par l'allèle *e* de ces races.

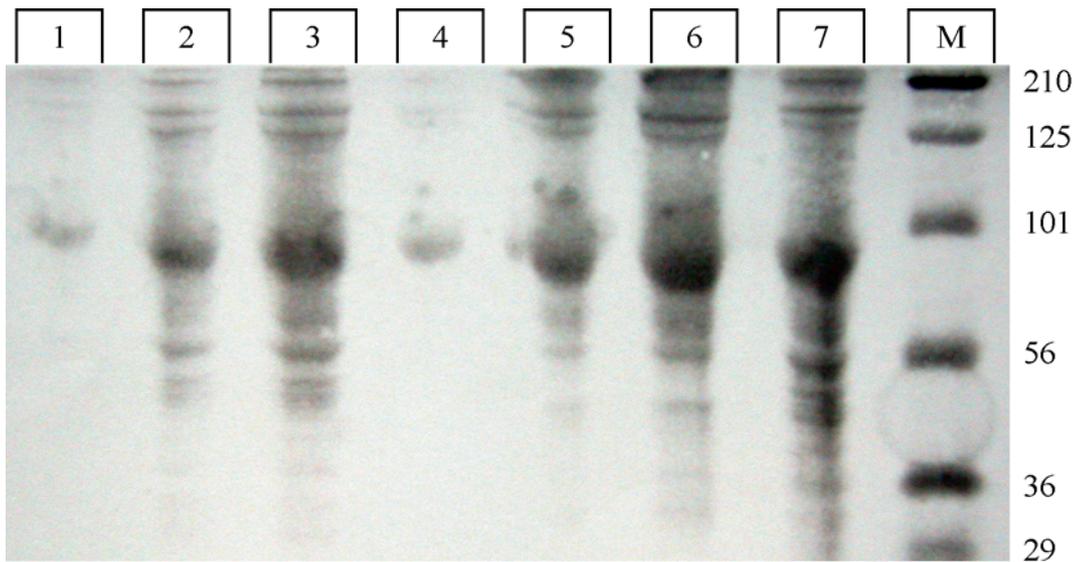


Figure 55 : Profil électrophorétique d'extraits protéiques de peau colorés au Bleu de Coomassie.

Pistes 1 à 3 : 5, 15 et 30 μg de protéines de Prim'Holstein (région noire) ; 4 à 6 : 5, 15 et 30 μg de protéines humaines (femme noire) ; 7 : 30 μg de protéines de Maine-Anjou (région rouge) ; M : marqueur de poids moléculaire en kDa.

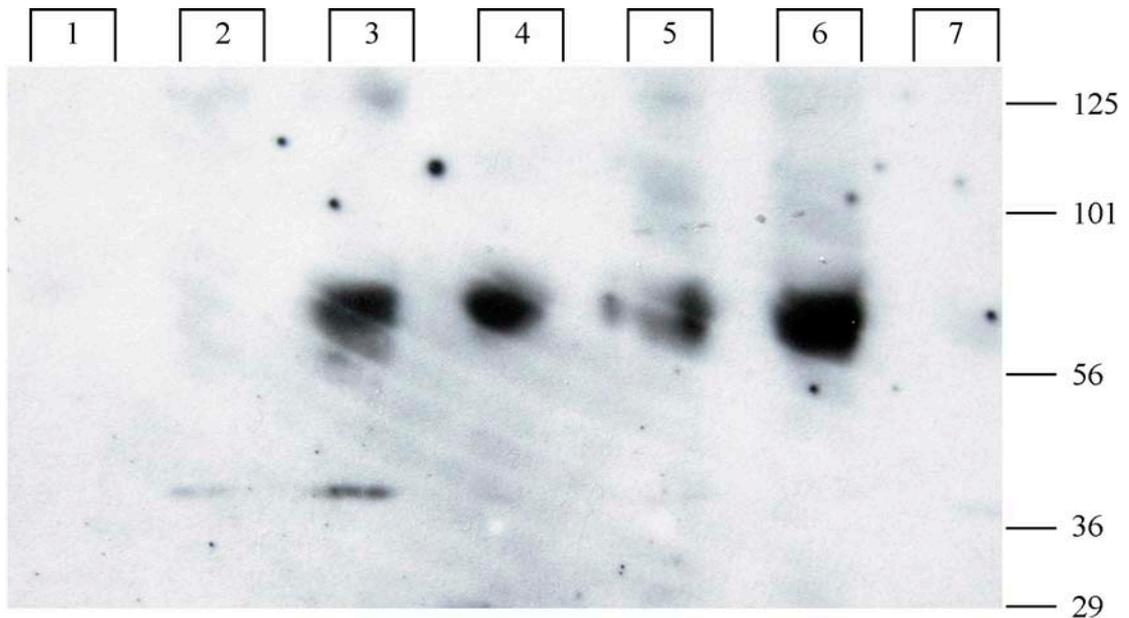


Figure 56 : Autoradiographie de protéines de peaux bovines et humaines hybridées avec α -PEP1h.

Pistes 1 à 3 : 5, 15 et 30 μg de protéines de Prim'Holstein (région noire) ; 4 à 6 : 5, 15 et 30 μg de protéines humaines (femme noire) ; 7 : 30 μg de protéines de Maine-Anjou (région rouge) ; les tailles du marqueur de poids moléculaire sont indiquées sur la droite en kDa.

V. Etude protéique par Western-Blot

Plusieurs échantillons de peaux bovines et humaines ont été séparés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE à 8,5%. Le profil obtenu (Figure 55) montre une série de bandes correspondant à des protéines de tailles différentes. On observe également que les profils humains et bovins sont similaires.

On détecte une bande à 70 kDa dans les pistes 4, 5 et 6 de la Figure 56 qui correspond à la taille attendue pour la protéine TYRP1 humaine. Un signal identique dans la piste 3 qui correspond à 30 µg de protéines de Prim'Holstein. On peut donc conclure que le signal bovin détecté est bien l'enzyme TYRP1 bovine. En revanche, on observe que le signal est absent dans la piste 7 correspondant à la Maine-Anjou. Cette expérience confirme donc, du moins pour la Maine-Anjou, que l'absence de transcription détectable de l'ARNm de *TYRP1* (Figure 51) se traduit par une absence de l'enzyme TYRP1 bovine.

On observe donc une corrélation entre la nature phéomélanogénique de la robe de la Maine-Anjou et l'absence d'activité TYRP1. Cela montre que TYRP1 n'est pas essentielle à la phéomélanogénèse chez le bovin, comme chez la souris (Kobayashi *et al.*, 1995). De plus, la plus faible quantité de pigments synthétisés, promue entre autres par une faible activité tyrosinase pourrait également être due à l'effet destabilisateur de l'absence de TYRP1 sur TYR (Hearing *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1998). On observe aussi que l'enzyme bovine détectée a un poids moléculaire similaire à son homologue humaine. Cette dernière étant glycosylée, on peut émettre l'hypothèse que TYRP1 bovine subirait elle aussi des maturations post-traductionnelles de type glycosylation.

CONCLUSION

PERSPECTIVES

Le phénotype de la robe des bovins, spécifié dans le Herd-Book de chaque race, constitue un des critères majeurs de la certification de l'appartenance d'un individu à une race donnée. La couleur de la robe est sous-tendue par des différences moléculaires au niveau des gènes impliqués dans l'établissement de ce phénotype. La mise en évidence de ces caractéristiques génétiques propres à chaque race permettrait la mise au point de tests moléculaires visant à déterminer l'origine raciale de n'importe quel échantillon bovin (viande et produits dérivés par exemple).

Inscrit dans ce cadre, mon travail de thèse a consisté à rechercher de telles différences dans les gènes contrôlant directement la synthèse des pigments mélaniques, *TYR*, *TYRP1* et *DCT*.

Une première étape de clonage de la partie codante de ces gènes montre que les enzymes codées par les gènes bovins *TYR*, *TYRP1* et *DCT* possèdent toutes les caractéristiques propres à ce type d'enzymes. Leurs propriétés catalytiques ainsi que leurs interactions pourraient être analogues à celles décrites chez l'Homme et la souris. Il faut toutefois noter que des différences notables existent entre les enzymes humaines et murines et qu'ainsi, des particularités propres aux enzymes bovines sont possibles. Il conviendrait donc de déterminer précisément la fonction catalytique des enzymes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* chez le bovin. De ces données pourrait découler une interprétation plus juste de la relation niveau d'expression-phénotype.

La recherche de polymorphismes dans la partie codante de ces gènes montre qu'aucun polymorphisme racial spécifique des races bovines étudiées ne peut être mis en évidence. Les phénotypes observés ne sont donc pas dus à des mutations engendrant la synthèse d'enzymes plus ou moins actives. Cependant, on ne peut pas exclure la présence de polymorphismes causals dans les régions promotrices et/ou introniques de ces gènes. Etant donné l'étendue de ces régions (Fryer *et al.*, 2003; Giraldo *et al.*, 2003; Regales *et al.*, 2003), il apparaît néanmoins hasardeux de se lancer dans de telles recherches dans l'état actuel des connaissances chez le bovin. Dans ce contexte, la disponibilité de données de séquençage du génome bovin permettrait de cibler plus aisément les régions qui nécessitent une étude approfondie.

L'analyse des niveaux d'expression des gènes de la famille tyrosinase permet de tirer un certain nombre de conclusions.

Les niveaux d'expression des gènes de la famille tyrosinase sont variables suivant les races. D'une manière générale, l'expression des trois gènes est sous-réglée par rapport aux niveaux observés dans la partie noire de la Prim'Holstein. Cependant, il n'existe pas de corrélation claire entre les niveaux d'expressions des gènes *TYR*, *TYRPI* et *DCT* et le phénotype des races observées. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne les races *e/e* avec, par exemple, la Blonde d'Aquitaine qui a un phénotype beaucoup plus clair que la Limousine mais possède des expressions de *TYR* et *DCT* supérieures à celles observées chez cette dernière. Chez la Gasconne, le phénotype gris pourrait néanmoins s'expliquer par la sous-régulation des gènes *TYR* et *TYRPI*.

Il existe une corrélation directe entre le phénotype phéomélanique, la présence de l'allèle *e* et l'absence d'expression de *TYRPI*. Ainsi, la régulation de *TYRPI* serait plus sensible à la non-fonctionnalité du récepteur tronqué codé par l'allèle *e* que les autres gènes, *TYR* et *DCT*. De plus, cette observation conforte s'il était besoin l'idée de plus en plus admise que les gènes de la famille tyrosinase sont régulés pour une large part grâce à des mécanismes indépendants. D'un point de vue enzymatique, l'absence d'expression de *TYRPI* chez les races à dominante phéomélanique indique que le rôle de *TYRPI* serait restreint à l'eumélanogénèse, à l'instar de la situation murine. L'absence d'expression de *TYRPI* est confirmée au niveau protéique par l'impossibilité de mettre en évidence la protéine *TYRPI*, chez la Maine-Anjou du moins.

Parmi les races *e/e*, seule la Charolaise, caractérisée par un phénotype extrêmement dilué, possède une assez forte expression des trois gènes. Cette contradiction apparente confirme le caractère épistatique de la mutation du gène *SILVER* caractéristique de cette race.

Les taux d'expression observés chez les individus croisés Prim'Holstein/Normande sont corrélés à la quantité de pigments eumélaniques noirs et inversement corrélés au taux d'expression du gène *AGOUTI*. La Normande posséderait un allèle *AGOUTI* spécifique, responsable de la bringeure, et soumis à des régulations subtiles, par épigénèse éventuellement (la recherche et la caractérisation de cet allèle font actuellement l'objet de la thèse de Michael Girardot).

La présence de cellules de la lignée mélanoblastique dans les parties blanches des croisés Prim'Holstein/Normande remet en cause l'hypothèse que les zones blanches apparaissent par défaut de migration des mélanoblastes vers ces zones.

Plusieurs perspectives se dégagent de ce travail. Tout d'abord, la caractérisation biochimique de l'activité des enzymes bovines ainsi que les mesures de qualité et de quantité de pigments présents dans les différents échantillons analysés contribuerait grandement à une analyse plus fine des niveaux d'expression observés.

L'extension de l'analyse du taux d'expression à l'ensemble des gènes de coloration connus (grâce à un microréseau d'ADN par exemple) permettrait d'avoir une vision globale du rôle que peuvent jouer tel ou tel gène dans la définition du patron de coloration de la robe. Les résultats découlants de ce genre de travaux orienteraient certainement de façon efficace la poursuite de la thématique de recherche de marqueurs spécifiques des races bovines.

Afin de préciser les mécanismes d'activation de l'enzyme tyrosinase, il serait utile d'évaluer le rôle que pourrait jouer la phosphorylation de la S582 et donc l'implication de la PKC dans ce mécanisme s'il existe.

La nature glycoprotéique de TYRP1, suggérée par hybridation moléculaire de type western-blot, pourrait être confirmée par traitement à la PNGase.

Il serait également intéressant de rechercher la présence de cellules de la lignée mélanoblastique dans les follicules pileux des zones blanches.

L'explication des différences de coloration entre les races phéoméliques *e/e* réside sûrement dans des particularités des facteurs de régulation des gènes de la famille tyrosinase, qu'il s'agisse de facteurs agissant en cis (régions régulatrices, etc...) ou de facteurs agissant en trans (facteurs de transcriptions). La recherche et la caractérisation des facteurs impliqués constituent une des perspectives majeures de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Malek, Z. A., M. C. Scott, M. Furumura, M. L. Lamoreux, M. Ollmann, G. S. Barsh and V. J. Hearing (2001). The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *J Cell Sci* 114(Pt 5): 1019-24.
- Adalsteinsson, S., S. Bjarnadottir, D. I. Vage and J. V. Jonmundsson (1995). Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. *J Hered* 86(5): 395-8.
- Aksan, I. and C. R. Goding (1998). Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 18(12): 6930-8.
- Amae, S., K. Yasumoto, K. Takeda, T. Udono, K. Takahashi and S. Shibahara (2000). Identification of a composite enhancer of the human tyrosinase-related protein 2/DOPACHrome tautomerase gene. *Biochim Biophys Acta* 1492(2-3): 505-8.
- Aubin-Houzelstein, G., F. Bernex, C. Elbaz and J. J. Panthier (1998). Survival of patchwork melanoblasts is dependent upon their number in the hair follicle at the end of embryogenesis. *Dev Biol* 198(2): 266-76.
- Bahadoran, P., E. Aberdam, F. Mantoux, R. Busca, K. Bille, N. Yalman, G. de Saint-Basile, R. Casaroli-Marano, J. P. Ortonne and R. Ballotti (2001). Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol* 152(4): 843-50.
- Bahadoran, P., R. Busca, C. Chiaverini, W. Westbroek, J. Lambert, K. Bille, G. Valony, M. Fukuda, J. M. Naeyaert, J. P. Ortonne and R. Ballotti (2003). Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J Biol Chem* 278(13): 11386-92.
- Barber, J. I., D. Townsend, D. P. Olds and R. A. King (1985). Decreased dopachrome oxidoreductase activity in yellow mice. *J Hered* 76(1): 59-60.
- Barrington, A. and K. Pearson (1906). On the inheritance of coat color in cattle. I. Shorthorn crosses and pure Shorthorn. *Biometrika* 4: 427-437.
- Barriocanal, J. G., J. S. Bonifacino, L. Yuan and I. V. Sandoval (1986). Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem* 261(35): 16755-63.
- Beermann, F., S. J. Orlow, R. E. Boissy, A. Schmidt, Y. L. Boissy and M. L. Lamoreux (1995). Misrouting of tyrosinase with a truncated cytoplasmic tail as a result of the murine platinum (cp) mutation. *Exp Eye Res* 61(5): 599-607.
- Beermann, F., E. Schmid, R. Ganss, G. Schutz and S. Ruppert (1992). Molecular characterization of the mouse tyrosinase gene: pigment cell-specific expression in transgenic mice. *Pigment Cell Res* 5(5 Pt 2): 295-9.
- Benathan, M. (1997). Opposite regulation of tyrosinase and glutathione peroxidase by intracellular thiols in human melanoma cells. *Arch Dermatol Res* 289(6): 341-6.
- Bennett, D. C. and M. L. Lamoreux (2003). The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* 16(4): 333-44.
- Berryere, T. G., S. M. Schmutz, R. J. Schimpf, C. M. Cowan and J. Potter (2003). TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Anim Genet* 34(3): 169-75.
- Berson, J. F., D. W. Frank, P. A. Calvo, B. M. Bieler and M. S. Marks (2000). A common temperature-sensitive allelic form of human tyrosinase is retained in the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. *J Biol Chem* 275(16): 12281-9.

- Bertolotto, C., P. Abbe, T. J. Hemesath, K. Bille, D. E. Fisher, J. P. Ortonne and R. Ballotti (1998a). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 142(3): 827-35.
- Bertolotto, C., R. Busca, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne and R. Ballotti (1998b). Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol* 18(2): 694-702.
- Berzelius, J. J. (1840). *Lehrbuch Chem* 9: 522.
- Boissy, R. E., C. Sakai, H. Zhao, T. Kobayashi and V. J. Hearing (1998). Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp Dermatol* 7(4): 198-204.
- Bologna, J. L. and S. J. Orlow (2003a). *Melanocyte Biology. Dermatology*. Harcourt. London, Elsevier: 937.
- Bologna, J. L. and S. J. Orlow (2003b). *Melanocyte Biology. Dermatology*. Harcourt. London, Elsevier: 943.
- Borovansky, J. (1994). Zinc in pigmented cells and structures, interactions and possible roles. *Sb Lek* 95(4): 309-320.
- Box, N. F., J. R. Wyeth, C. J. Mayne, L. E. O'Gorman, N. G. Martin and R. A. Sturm (1998). Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1. *Mamm Genome* 9(1): 50-3.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Branza-Nichita, N., G. Negroiu, A. J. Petrescu, E. F. Garman, F. M. Platt, M. R. Wormald, R. A. Dwek and S. M. Petrescu (2000). Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J Biol Chem* 275(11): 8169-75.
- Branza-Nichita, N., A. J. Petrescu, R. A. Dwek, M. R. Wormald, F. M. Platt and S. M. Petrescu (1999). Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem Biophys Res Commun* 261(3): 720-5.
- Budd, P. S. and I. J. Jackson (1995). Structure of the mouse tyrosinase-related protein-2/dopachrome tautomerase (Tyrp2/Dct) gene and sequence of two novel slaty alleles. *Genomics* 29(1): 35-43.
- Burchill, S. A. and A. J. Thody (1986). Melanocyte-stimulating hormone and the regulation of tyrosinase activity in hair follicular melanocytes of the mouse. *J Endocrinol* 111(2): 225-32.
- Calvo, P. A., D. W. Frank, B. M. Bieler, J. F. Berson and M. S. Marks (1999). A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J Biol Chem* 274(18): 12780-9.
- Carreira, S., T. J. Dexter, U. Yavuzer, D. J. Easty and C. R. Goding (1998). Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* 18(9): 5099-108.
- Charlier, C., B. Denys, J. I. Belanche, W. Coppieters, L. Grobet, M. Mni, J. Womack, R. Hanset and M. Georges (1996). Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer disease. *Mamm Genome* 7(2): 138-42.
- Chhajlani, V. and J. E. Wikberg (1992). Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309(3): 417-20.

- Chintamaneni, C. D., R. Halaban, Y. Kobayashi, C. J. Witkop, Jr. and B. S. Kwon (1991). A single base insertion in the putative transmembrane domain of the tyrosinase gene as a cause for tyrosinase-negative oculocutaneous albinism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12): 5272-6.
- Cole, D., H. W. Leipold and R. Schalles (1984). Oculocutaneous hypopigmentation of Angus cattle. *Bovine Practitioner*(19): 92-99.
- Crepaldi, P., M. Marilli, D. Meggiolaro, F. Fornarelli, C. Renieri, E. Milanesi and P. Ajmone-Marsan (2003). SP-10 The MC1R gene polymorphism in some cattle breeds raised in Italy. *Pigment Cell Res* 16(5): 578.
- Dakour, J., T. Vinayagamoorthy, K. Jimbow, H. Chen, D. Luo, W. Dixon and V. Munoz (1993). Identification of a cDNA coding for a Ca(2+)-binding phosphoprotein (p90), calnexin, on melanosomes in normal and malignant human melanocytes. *Exp Cell Res* 209(2): 288-300.
- Davis, C. G. (1990). The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* 2(5): 410-9.
- del Marmol, V., S. Ito, B. Bouchard, A. Libert, K. Wakamatsu, G. Ghanem and F. Solano (1996). Cysteine deprivation promotes eumelanogenesis in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 107(5): 698-702.
- Dell'Angelica, E. C., V. Shotelersuk, R. C. Aguilar, W. A. Gahl and J. S. Bonifacino (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* 3(1): 11-21.
- Der, J. E., W. T. Dixon, K. Jimbow and T. Horikoshi (1993). A murine monoclonal antibody, MoAb HMSA-5, against a melanosomal component highly expressed in early stages, and common to normal and neoplastic melanocytes. *Br J Cancer* 67(1): 47-57.
- Diment, S., M. Eidelman, G. M. Rodriguez and S. J. Orlow (1995). Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J Biol Chem* 270(9): 4213-5.
- Eisen, T., D. J. Easty, D. C. Bennett and C. R. Goding (1995). The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene* 11(10): 2157-64.
- Falcon-Perez, J. M. and E. C. Dell'Angelica (2002). The pallidin (Pldn) gene and the role of SNARE proteins in melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res* 15(2): 82-6.
- Fang, D., T. Kute and V. Setaluri (2001). Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology. *Pigment Cell Res* 14(2): 132-9.
- Fang, D. and V. Setaluri (1999). Role of microphthalmia transcription factor in regulation of melanocyte differentiation marker TRP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 256(3): 657-63.
- Fang, D., Y. Tsuji and V. Setaluri (2002). Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF. *Nucleic Acids Res* 30(14): 3096-106.
- Feng, G. H., T. Bailin, J. Oh and R. A. Spritz (1997). Mouse pale ear (ep) is homologous to human Hermansky-Pudlak syndrome and contains a rare 'AT-AC' intron. *Hum Mol Genet* 6(5): 793-7.
- Fleischman, R. A. (1992). Human piebald trait resulting from a dominant negative mutant allele of the c-kit membrane receptor gene. *J Clin Invest* 89(6): 1713-7.

- Frand, A. R., J. W. Cuzzo and C. A. Kaiser (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* 10(5): 203-10.
- Fryer, J. P., W. S. Oetting and R. A. King (2003). Identification and characterization of a DNase hypersensitive region of the human tyrosinase gene. *Pigment Cell Res* 16(6): 679-84.
- Fukuda, M., T. S. Kuroda and K. Mikoshiba (2002). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem* 277(14): 12432-6.
- Furumura, M., C. Sakai, Z. Abdel-Malek, G. S. Barsh and V. J. Hearing (1996). The interaction of agouti signal protein and melanocyte stimulating hormone to regulate melanin formation in mammals. *Pigment Cell Res* 9(4): 191-203.
- Furumura, M., F. Solano, N. Matsunaga, C. Sakai, R. A. Spritz and V. J. Hearing (1998). Metal ligand-binding specificities of the tyrosinase-related proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 242(3): 579-85.
- Gaggioli, C., R. Busca, P. Abbe, J. P. Ortonne and R. Ballotti (2003). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res* 16(4): 374-82.
- Galibert, M. D., S. Carreira and C. R. Goding (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *Embo J* 20(17): 5022-31.
- Galibert, M. D., U. Yavuzer, T. J. Dexter and C. R. Goding (1999). Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *J Biol Chem* 274(38): 26894-900.
- Garcia-Borron, J. C. and F. Solano (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* 15(3): 162-73.
- Giebel, L. B., K. M. Strunk and R. A. Spritz (1991a). Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics* 9(3): 435-45.
- Giebel, L. B., R. K. Tripathi, K. M. Strunk, J. M. Hanifin, C. E. Jackson, R. A. King and R. A. Spritz (1991b). Tyrosinase gene mutations associated with type IB ("yellow") oculocutaneous albinism. *Am J Hum Genet* 48(6): 1159-67.
- Giraldo, P., A. Martinez, L. Regales, A. Lavado, A. Garcia-Diaz, A. Alonso, A. Busturia and L. Montoliu (2003). Functional dissection of the mouse tyrosinase locus control region identifies a new putative boundary activity. *Nucleic Acids Res* 31(21): 6290-305.
- Goding, C. R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14(14): 1712-28.
- Granholt, N. H., A. J. Opbroek, G. A. Harvison and K. E. Kappenman (1990). Tyrosinase activity (TH, DO, PAGE-defined isozymes) and melanin production in regenerating hairbulb melanocytes of lethal yellow (Ay/a), black (a/a), agouti (AwJ/AwJ) and albino (a/a/c2J/c2J) mice (C57BL/6J). *Pigment Cell Res* 3(5): 233-42.
- Griscelli, C., A. Durandy, D. Guy-Grand, F. Daguillard, C. Herzog and M. Prunieras (1978). A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am J Med* 65(4): 691-702.
- Halaban, R., E. Cheng, S. Svedine, R. Aron and D. N. Hebert (2001). Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J Biol Chem* 276(15): 11933-8.

- Halaban, R., E. Cheng, Y. Zhang, G. Moellmann, D. Hanlon, M. Michalak, V. Setaluri and D. N. Hebert (1997). Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6210-5.
- Halaban, R. and G. Moellmann (1990). Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12): 4809-13.
- Halaban, R., S. H. Pomerantz, S. Marshall, D. T. Lambert and A. B. Lerner (1983). Regulation of tyrosinase in human melanocytes grown in culture. *J Cell Biol* 97(2): 480-8.
- Halaban, R., S. Svedine, E. Cheng, Y. Smicun, R. Aron and D. N. Hebert (2000). Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5889-94.
- Harrison, M. D., C. E. Jones, M. Solioz and C. T. Dameron (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* 25(1): 29-32.
- Hearing, V. J. and K. Tsukamoto (1991). Enzymatic control of pigmentation in mammals. *Faseb J* 5(14): 2902-9.
- Hearing, V. J., K. Tsukamoto, K. Urabe, K. Kameyama, P. M. Montague and I. J. Jackson (1992). Functional properties of cloned melanogenic proteins. *Pigment Cell Res* 5(5 Pt 2): 264-70.
- Helenius, A., T. Marquardt and I. Braakman (1992). The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol* 2(8): 227-31.
- High, S., F. J. Lecomte, S. J. Russell, B. M. Abell and J. D. Oliver (2000). Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett* 476(1-2): 38-41.
- Hirobe, T. and H. Abe (1999). Genetic and epigenetic control of the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in culture. *Pigment Cell Res* 12(3): 147-63.
- Hodgkinson, C. A., K. J. Moore, A. Nakayama, E. Steingrimsson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and H. Arnheiter (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74(2): 395-404.
- Honing, S., I. V. Sandoval and K. von Figura (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *Embo J* 17(5): 1304-14.
- Hoth, C. F., A. Milunsky, N. Lipsky, R. Sheffer, S. K. Clarren and C. T. Baldwin (1993). Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Am J Hum Genet* 52(3): 455-62.
- Hume, A. N., L. M. Collinson, A. Rapak, A. Q. Gomes, C. R. Hopkins and M. C. Seabra (2001). Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152(4): 795-808.
- Hustad, C. M., W. L. Perry, L. D. Siracusa, C. Rasberry, L. Cobb, B. M. Cattanch, R. Kovatch, N. G. Copeland and N. A. Jenkins (1995). Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics* 140(1): 255-65.
- Ibsen, H. L. (1933). Cattle inheritance. I. Colour. *Genetics* 18: 441-480.

- Ito, S. (1993). High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of eu- and pheomelanin in melanogenesis control. *J Invest Dermatol* 100(2 Suppl): 166S-171S.
- Jackson, I. J. (1993). Molecular genetics. Colour-coded switches. *Nature* 362(6421): 587-8.
- Jackson, I. J. and D. C. Bennett (1990). Identification of the albino mutation of mouse tyrosinase by analysis of an in vitro revertant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7010-4.
- Jackson, I. J., D. Chambers, E. M. Rinchik and D. C. Bennett (1990). Characterization of TRP-1 mRNA levels in dominant and recessive mutations at the mouse brown (b) locus. *Genetics* 126(2): 451-9.
- Jackson, I. J., D. M. Chambers, K. Tsukamoto, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and V. Hearing (1992). A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *Embo J* 11(2): 527-35.
- Jimbow, K. (1995). Current update and trends in melanin pigmentation and melanin biology. *Keio J Med* 44(1): 9-18.
- Jimbow, K., J. S. Park, F. Kato, K. Hirosaki, K. Toyofuku, C. Hua and T. Yamashita (2000). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res* 13(4): 222-9.
- Jimbow, K., M. Takahashi, S. Sato and A. Kukita (1971). Ultrastructural and cytochemical studies of melanogenesis in melanocytes of normal human hair matrix. *J Electron Microsc (Tokyo)* 20(2): 87-92.
- Jimenez, M., K. Kameyama, W. L. Maloy, Y. Tomita and V. J. Hearing (1988). Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(11): 3830-4.
- Jimenez-Cervantes, C., J. C. Garcia-Borrón, P. Valverde, F. Solano and J. A. Lozano (1993). Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur J Biochem* 217(2): 549-56.
- Jimenez-Cervantes, C., M. Martinez-Esparza, F. Solano, J. A. Lozano and J. C. Garcia-Borrón (1998). Molecular interactions within the melanogenic complex: formation of heterodimers of tyrosinase and TRP1 from B16 mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 253(3): 761-7.
- Jimenez-Cervantes, C., F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V. J. Hearing, J. A. Lozano and J. C. Garcia-Borrón (1994). A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem* 269(27): 17993-8000.
- Joerg, H., H. R. Fries, E. Meijerink and G. F. Stranzinger (1996). Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm Genome* 7(4): 317-8.
- Johnson, R. and I. J. Jackson (1992). Light is a dominant mouse mutation resulting in premature cell death. *Nat Genet* 1(3): 226-9.
- Kanheti, P., X. Qiao, M. E. Diaz, A. A. Peden, G. E. Meyer, S. L. Carskadon, D. Kapfhamer, D. Sufalko, M. S. Robinson, J. L. Noebels and M. Burmeister (1998). Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* 21(1): 111-22.
- Kappenman, K. E., M. A. Dvoracek, G. A. Harvison, B. B. Fuller and N. H. Granholm (1992). Tyrosinase abundance and activity in murine hairbulb melanocytes of agouti mutants (C57BL/6J-a/a, Ay/a, and AwJ/AwJ). *Pigment Cell Res Suppl* 2: 79-83.

- Kato, F., I. Wada and K. Jimbow (1998). Interaction of calnexin and calreticulin is required for acid-resistant structure and correct processing of tyrosinase-related protein from ER to melanosomes. *J Invest Dermatol* 110: 568.
- Kelleher, J. F. and M. A. Titus (1998). Intracellular motility: how can we all work together? *Curr Biol* 8(11): R394-7.
- Kelsall, S. R., N. Le Fur and B. Mintz (1997). Qualitative and quantitative catalog of tyrosinase alternative transcripts in normal murine skin melanocytes as a basis for detecting melanoma-specific changes. *Biochem Biophys Res Commun* 236(1): 173-7.
- Khaled, M., L. Larribere, K. Bille, J. P. Ortonne, R. Ballotti and C. Bertolotto (2003). Microphthalmia associated transcription factor is a target of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *J Invest Dermatol* 121(4): 831-6.
- Klabunde, T., C. Eicken, J. C. Sacchettini and B. Krebs (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol* 5(12): 1084-90.
- Klungland, H., K. H. Roed, C. L. Nesbo, K. S. Jakobsen and D. I. Vage (1999). The melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1-R) gene as a tool in evolutionary studies of artiodactyles. *Hereditas* 131(1): 39-46.
- Klungland, H. and D. I. Vage (1999). Presence of the dominant extension allele E(D) in red and mosaic cattle. *Pigment Cell Res* 12(6): 391-3.
- Klungland, H. and D. I. Vage (2003). Pigmentary switches in domestic animal species. *Ann N Y Acad Sci* 994: 331-8.
- Klungland, H., D. I. Vage, L. Gomez-Raya, S. Adalsteinsson and S. Lien (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6(9): 636-9.
- Kluppel, M., F. Beermann, S. Ruppert, E. Schmid, E. Hummler and G. Schutz (1991). The mouse tyrosinase promoter is sufficient for expression in melanocytes and in the pigmented epithelium of the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9): 3777-81.
- Kobayashi, T., G. Imokawa, D. C. Bennett and V. J. Hearing (1998). Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J Biol Chem* 273(48): 31801-5.
- Kobayashi, T., K. Urabe, A. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J. C. Garcia-Borrón and V. J. Hearing (1994). Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *Embo J* 13(24): 5818-25.
- Kobayashi, T., W. D. Vieira, B. Potterf, C. Sakai, G. Imokawa and V. J. Hearing (1995). Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J Cell Sci* 108 (Pt 6): 2301-9.
- Kuroda, T. S., H. Ariga and M. Fukuda (2003). The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes. *Mol Cell Biol* 23(15): 5245-55.
- Kuroda, T. S., M. Fukuda, H. Ariga and K. Mikoshiba (2002). The Slp homology domain of synaptotagmin-like proteins 1-4 and Slac2 functions as a novel Rab27A binding domain. *J Biol Chem* 277(11): 9212-8.
- Kushimoto, T., V. Basur, J. Valencia, J. Matsunaga, W. D. Vieira, V. J. Ferrans, J. Muller, E. Appella and V. J. Hearing (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10698-703.
- Kushimoto, T., J. C. Valencia, G. E. Costin, K. Toyofuku, H. Watabe, K. Yasumoto, F. Rouzaud, W. D. Vieira and V. J. Hearing (2003). The Seiji memorial lecture: the

- melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Res* 16(3): 237-44.
- Lacour, J. P., P. R. Gordon, M. Eller, J. Bhawan and B. A. Gilchrest (1992). Cytoskeletal events underlying dendrite formation by cultured pigment cells. *J Cell Physiol* 151(2): 287-99.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-5.
- Lambert, J., G. Vancoillie and J. M. Naeyaert (1999). Molecular motors and their role in pigmentation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(7): 905-18.
- Lamoreux, M. L., C. Woolley and P. Pendergast (1986). Genetic controls over activities of tyrosinase and dopachrome conversion factor in murine melanocytes. *Genetics* 113(4): 967-84.
- Land, E. J., C. A. Ramsden and P. A. Riley (2003). Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines. *Acc Chem Res* 36(5): 300-8.
- Lauvergne, J. J. (1966). Génétique de la couleur du pelage des bovins domestiques. *Bibliographia Genetica* 20: 1-168.
- Lee, M., J. Goodall, C. Verastegui, R. Ballotti and C. R. Goding (2000). Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J Biol Chem* 275(48): 37978-83.
- Lerch, K. (1988). Protein and active-site structure of tyrosinase. *Prog Clin Biol Res* 256: 85-98.
- Lerner, A. B., T. B. Fitzpatrick, E. Calkins and W. H. Summerson (1950). Mammalian tyrosinase; the relationship of copper to enzymatic activity. *J Biol Chem* 187(2): 793-802.
- Lindner, J. R., M. L. Kahn, S. R. Coughlin, G. R. Sambrano, E. Schauble, D. Bernstein, D. Foy, A. Hafezi-Moghadam and K. Ley (2000). Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol* 165(11): 6504-10.
- Liu, T. F., G. Kandala and V. Setaluri (2001). PDZ domain protein GIPC interacts with the cytoplasmic tail of melanosomal membrane protein gp75 (tyrosinase-related protein-1). *J Biol Chem* 276(38): 35768-77.
- Loftus, S. K., D. M. Larson, L. L. Baxter, A. Antonellis, Y. Chen, X. Wu, Y. Jiang, M. Bittner, J. A. Hammer, 3rd and W. J. Pavan (2002). Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4471-6.
- Mahalingam, H., A. Watanabe, M. Tachibana and R. M. Niles (1997). Characterization of density-dependent regulation of the tyrosinase gene promoter: role of protein kinase C. *Exp Cell Res* 237(1): 83-92.
- Manga, P., K. Sato, L. Ye, F. Beermann, M. L. Lamoreux and S. J. Orlow (2000). Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro. *Pigment Cell Res* 13(5): 364-74.
- Marks, M. S. and M. C. Seabra (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 738-48.
- Matesic, L. E., R. Yip, A. E. Reuss, D. A. Swing, T. N. O'Sullivan, C. F. Fletcher, N. G. Copeland and N. A. Jenkins (2001). Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10238-43.
- Maudet, C. and P. Taberlet (2002). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphism. *J Dairy Sci* 85(4): 707-15.

- Menasche, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist and G. de Saint Basile (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 25(2): 173-6.
- Molinari, M. and A. Helenius (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 288(5464): 331-3.
- Morgan, H. D., H. G. Sutherland, D. I. Martin and E. Whitelaw (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23(3): 314-8.
- Mountjoy, K. G., L. S. Robbins, M. T. Mortrud and R. D. Cone (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257(5074): 1248-51.
- Movaghar, M. and D. M. Hunt (1987). Tyrosinase activity and the expression of the agouti gene in the mouse. *J Exp Zool* 243(3): 473-80.
- Nakamura, M., D. J. Tobin, B. Richards-Smith, J. P. Sundberg and R. Paus (2002). Mutant laboratory mice with abnormalities in pigmentation: annotated tables. *J Dermatol Sci* 28(1): 1-33.
- Negroiu, G., N. Branza-Nichita, G. E. Costin, H. Titu, A. J. Petrescu, R. A. Dwek and S. M. Petrescu (1999a). Investigation of the intracellular transport of tyrosinase and tyrosinase related protein (TRP)-1. The effect of endoplasmic reticulum (ER)-glucosidases inhibition. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(7): 1001-10.
- Negroiu, G., N. Branza-Nichita, A. J. Petrescu, R. A. Dwek and S. M. Petrescu (1999b). Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells. *Biochem J* 344 Pt 3: 659-65.
- Nilsson, I. and G. von Heijne (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J Biol Chem* 275(23): 17338-43.
- Nordlund, J. J., R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King and J.-P. Ortonne (1998). The Pigmentary System - Physiology and Physiopathology. Oxford, Oxford University Press.
- Odorizzi, G., C. R. Cowles and S. D. Emr (1998). The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol* 8(7): 282-8.
- Oetting, W. S. (2000). The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res* 13(5): 320-5.
- Oetting, W. S., J. P. Fryer and R. A. King (1998). Mutations of the human tyrosinase gene associated with tyrosinase related oculocutaneous albinism (OCA1). Mutations in brief no. 204. Online. *Hum Mutat* 12(6): 433-4.
- Oetting, W. S., J. P. Fryer, S. Shriram and R. A. King (2003). Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years. *Pigment Cell Res* 16(3): 307-11.
- Okazaki, K., M. Uzuka, F. Morikawa, K. Toda and M. Seiji (1976). Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J Invest Dermatol* 67(4): 541-7.
- Olivares, C., J. C. Garcia-Borron and F. Solano (2002). Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 41(2): 679-86.
- Olivares, C., C. Jimenez-Cervantes, J. A. Lozano, F. Solano and J. C. Garcia-Borron (2001). The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J* 354(Pt 1): 131-9.

- Olivares, C., F. Solano and J. C. Garcia-Borron (2003). Conformation-dependent post-translational glycosylation of tyrosinase. Requirement of a specific interaction involving the CuB metal binding site. *J Biol Chem* 278(18): 15735-43.
- Olson, T. A. (1980). Choice of a wild-type standard in colour genetics of domestic cattle. *J. Hered.* 71: 442-444.
- Olson, T. A. and R. L. Willham (1982). Inheritance of coat colour in cattle: a review. Ames, Iowa, Iowa State University and Agricultural Experiment Station Bulletin 595.
- Orlow, S. J., B. K. Zhou, A. K. Chakraborty, M. Drucker, S. Pifko-Hirst and J. M. Pawelek (1994). High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex. *J Invest Dermatol* 103(2): 196-201.
- Park, H. Y., J. M. Perez, R. Laursen, M. Hara and B. A. Gilchrist (1999). Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274(23): 16470-8.
- Pastural, E., F. J. Barrat, R. Dufourcq-Lagelouse, S. Certain, O. Sanal, N. Jabado, R. Seger, C. Griscelli, A. Fischer and G. de Saint Basile (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 16(3): 289-92.
- Petrescu, S. M., N. Branza-Nichita, G. Negroiu, A. J. Petrescu and R. A. Dwek (2000). Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry* 39(18): 5229-37.
- Petris, M. J., D. Strausak and J. F. Mercer (2000). The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet* 9(19): 2845-51.
- Pingault, V., N. Bondurand, K. Kuhlbrodt, D. E. Goerich, M. O. Prehu, A. Puliti, B. Herbarth, I. Hermans-Borgmeyer, E. Legius, G. Matthijs, J. Amiel, S. Lyonnet, I. Ceccherini, G. Romeo, J. C. Smith, A. P. Read, M. Wegner and M. Goossens (1998). SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18(2): 171-3.
- Pisarra, P., R. Lupetti, A. Palumbo, A. Napolitano, G. Prota, G. Parmiani, A. Anichini and M. Sensi (2000). Human melanocytes and melanomas express novel mRNA isoforms of the tyrosinase-related protein-2/DOPAchrome tautomerase gene: molecular and functional characterization. *J Invest Dermatol* 115(1): 48-56.
- Ponnazhagan, S., L. Hou and B. S. Kwon (1994). Structural organization of the human tyrosinase gene and sequence analysis and characterization of its promoter region. *J Invest Dermatol* 102(5): 744-8.
- Porter, S., L. Larue and B. Mintz (1991). Mosaicism of tyrosinase-locus transcription and chromatin structure in dark vs. light melanocyte clones of homozygous chinchilla-mottled mice. *Dev Genet* 12(6): 393-402.
- Porter, S. and B. Mintz (1991). Multiple alternatively spliced transcripts of the mouse tyrosinase-encoding gene. *Gene* 97(2): 277-82.
- Potterf, S. B., R. Mollaaghababa, L. Hou, E. M. Southard-Smith, T. J. Hornyak, H. Arnheiter and W. J. Pavan (2001). Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev Biol* 237(2): 245-57.
- Prota, G. (1992). Melanins and Melanogenesis, Academic Press.
- Quittet, E. (1963). Races bovines françaises. Paris, La Maison Rustique.

- Raposo, G., D. Tenza, D. M. Murphy, J. F. Berson and M. S. Marks (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 152(4): 809-24.
- Rawls, J. F., E. M. Mellgren and S. L. Johnson (2001). How the zebrafish gets its stripes. *Dev Biol* 240(2): 301-14.
- Regales, L., P. Giraldo, A. Garcia-Diaz, A. Lavado and L. Montoliu (2003). Identification and functional validation of a 5' upstream regulatory sequence in the human tyrosinase gene homologous to the locus control region of the mouse tyrosinase gene. *Pigment Cell Res* 16(6): 685-92.
- Reish, O., D. Townsend, S. A. Berry, M. Y. Tsai and R. A. King (1995). Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 57(1): 127-32.
- Rieder, S., S. Taourit, D. Mariat, B. Langlois and G. Guerin (2001). Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm Genome* 12(6): 450-5.
- Riley, P. A. (1997). Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29(11): 1235-9.
- Riley, P. A. (2003). Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res* 16(5): 548-52.
- Rinchik, E. M., S. J. Bultman, B. Horsthemke, S. T. Lee, K. M. Strunk, R. A. Spritz, K. M. Avidano, M. T. Jong and R. D. Nicholls (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* 361(6407): 72-6.
- Rittenhouse, E. (1968). Genetic effect on fine structure and development of pigment granules in mouse hair bulb melanocytes. I. The b and d loci. *Dev Biol* 17(4): 351-65.
- Robbins, L. S., J. H. Nadeau, K. R. Johnson, M. A. Kelly, L. Roselli-Rehfuss, E. Baack, K. G. Mountjoy and R. D. Cone (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72(6): 827-34.
- Rodionov, V. I., A. J. Hope, T. M. Svitkina and G. G. Borisy (1998). Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Curr Biol* 8(3): 165-8.
- Rogers, S. L. and V. I. Gelfand (1998). Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol* 8(3): 161-4.
- Roseblat, S., D. Durham-Pierre, J. M. Gardner, Y. Nakatsu, M. H. Brilliant and S. J. Orlow (1994). Identification of a melanosomal membrane protein encoded by the pink-eyed dilution (type II oculocutaneous albinism) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 12071-75.
- Rosenzweig, A. C. and T. V. O'Halloran (2000). Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr Opin Chem Biol* 4(2): 140-7.
- Rothman, J. E. and F. T. Wieland (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272(5259): 227-34.
- Roux, L. and K. O. Lloyd (1986). Glycosylation characteristics of pigmentation-associated antigen (GP75): an intracellular glycoprotein of human melanocytes and malignant melanomas. *Arch Biochem Biophys* 251(1): 87-96.
- Rouzaud, F., J. Martin, P. F. Gallet, D. Delourme, V. Goulemot-Leger, Y. Amigues, F. Ménéssier, H. Levéziel, R. Julien and A. Oulmouden (2000). A first genotyping assay based on a new allele of the *extension* gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet Sel Evol* 32: 511-20.

- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Sato, S., R. Toyoda, Y. Katsuyama, H. Saiga, T. Numakunai, K. Ikeo, T. Gojobori, I. Yajima and H. Yamamoto (1999). Structure and developmental expression of the ascidian TRP gene: insights into the evolution of pigment cell-specific gene expression. *Dev Dyn* 215(3): 225-37.
- Schiaffino, M. V., C. Baschirotto, G. Pellegrini, S. Montalti, C. Tacchetti, M. De Luca and A. Ballabio (1996). The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17): 9055-60.
- Schmutz, S. M., T. G. Berryere, D. C. Ciobanu, A. J. Mileham, B. H. Schmitz and M. Fredholm (2002). Oculocutaneous albinism in Angus cattle. Plant and Animal Genome X, San Diego, CA.
- Schmutz, S. M., T. G. Berryere, D. C. Ciobanu, A. J. Mileham, B. H. Schmitz and M. Fredholm (2004). A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm Genome* 15(1): 62-7.
- Scott, G. and Q. Zhao (2001). Rab3a and SNARE proteins: potential regulators of melanosome movement. *J Invest Dermatol* 116(2): 296-304.
- Searle, A. G. (1968). Comparative genetics of coat colour in mammals. London, Logos Press.
- Seiberg, M., C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade-Gordon, M. Costanzo, M. Eisinger and S. S. Shapiro (2000a). Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol* 115(2): 162-7.
- Seiberg, M., C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade-Gordon, M. Costanzo, M. Eisinger and S. S. Shapiro (2000b). The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 254(1): 25-32.
- Seitz, J. J., S. M. Schmutz, T. D. Thue and F. C. Buchanan (1999). A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle. *Mamm Genome* 10(7): 710-2.
- Shibata, K., K. Takeda, Y. Tomita, H. Tagami and S. Shibahara (1992). Downstream region of the human tyrosinase-related protein gene enhances its promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 184(2): 568-75.
- Silvers, W. (1979). The Coat Colors of Mice. New York, Springer-Verlag.
- Simmen, T., A. Schmidt, W. Hunziker and F. Beermann (1999). The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J Cell Sci* 112 (Pt 1): 45-53.
- Smit, A. F. (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9(6): 657-63.
- Smit, N. P., H. Van der Meulen, H. K. Koerten, R. M. Kolb, A. M. Mommaas, E. G. Lentjes and S. Pavel (1997). Melanogenesis in cultured melanocytes can be substantially influenced by L-tyrosine and L-cysteine. *J Invest Dermatol* 109(6): 796-800.
- Solano, F., C. Jimenez-Cervantes, J. H. Martinez-Liarte, J. C. Garcia-Borron, J. R. Jara and J. A. Lozano (1996). Molecular mechanism for catalysis by a new zinc-enzyme, dopachrome tautomerase. *Biochem J* 313 (Pt 2): 447-53.
- Solano, F., J. H. Martinez-Liarte, C. Jimenez-Cervantes, J. C. Garcia-Borron and J. A. Lozano (1994). Dopachrome tautomerase is a zinc-containing enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 204(3): 1243-50.
- Spritz, R. A. (2000). Hermansky-Pudlak syndrome and pale ear: melanosome-making for the millennium. *Pigment Cell Res* 13(1): 15-20.

- Steingrimsson, E., K. J. Moore, M. L. Lamoreux, A. R. Ferre-D'Amare, S. K. Burley, D. C. Zimring, L. C. Skow, C. A. Hodgkinson, H. Arnheiter, N. G. Copeland and et al. (1994). Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet* 8(3): 256-63.
- Stinchcombe, J. C. and G. M. Griffiths (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* 147(1): 1-6.
- Strom, M., A. N. Hume, A. K. Tarafder, E. Barkagianni and M. C. Seabra (2002). A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J Biol Chem* 277(28): 25423-30.
- Sturm, R. A., B. J. O'Sullivan, N. F. Box, A. G. Smith, S. E. Smit, E. R. Puttick, P. G. Parsons and I. S. Dunn (1995). Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. *Genomics* 29(1): 24-34.
- Sturm, R. A., B. J. O'Sullivan, J. A. Thomson, N. Jamshidi, J. Pedley and P. G. Parsons (1994). Expression studies of pigmentation and POU-domain genes in human melanoma cells. *Pigment Cell Res* 7(4): 235-40.
- Sturm, R. A., R. D. Teasdale and N. F. Box (2001). Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277(1-2): 49-62.
- Tachibana, M. (2000). MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res* 13(4): 230-40.
- Takeuchi, S., T. Takeuchi and H. Yamamoto (2000). A possible mechanism for feedback regulation of the mouse tyrosinase gene by its 3' non-coding RNA fragments. *Pigment Cell Res* 13(2): 109-15.
- Tamate, H. B., T. Hirobe, K. Wakamatsu, S. Ito, S. Shibahara and K. Ishikawa (1989). Levels of tyrosinase and its mRNA in coat-color mutants of C57BL/10J congenic mice: effects of genic substitution at the agouti, brown, albino, dilute, and pink-eyed dilution loci. *J Exp Zool* 250(3): 304-11.
- Terao, M., L. Tabe, E. Garattini, D. Sartori, M. Studer and B. Mintz (1989). Isolation and characterization of variant cDNAs encoding mouse tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 159(2): 848-53.
- Toyofuku, K., I. Wada, K. Hirosaki, J. S. Park, Y. Hori and K. Jimbow (1999). Promotion of tyrosinase folding in COS 7 cells by calnexin. *J Biochem (Tokyo)* 125(1): 82-9.
- Toyofuku, K., I. Wada, J. C. Valencia, T. Kushimoto, V. J. Ferrans and V. J. Hearing (2001). Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *Faseb J* 15(12): 2149-61.
- Tripathi, R. K., C. Chaya Devi and A. Ramaiah (1988). pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in human skin. *Biochem J* 252(2): 481-7.
- Ujvari, A., R. Aron, T. Eisenhaure, E. Cheng, H. A. Parag, Y. Smicun, R. Halaban and D. N. Hebert (2001). Translation rate of human tyrosinase determines its N-linked glycosylation level. *J Biol Chem* 276(8): 5924-31.
- Vachtenheim, J., H. Novotna and G. Ghanem (2001). Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J Invest Dermatol* 117(6): 1505-11.

- Verastegui, C., K. Bille, J. P. Ortonne and R. Ballotti (2000). Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J Biol Chem* 275(40): 30757-60.
- Vijayasradhi, S., P. M. Doskoch and A. N. Houghton (1991). Biosynthesis and intracellular movement of the melanosomal membrane glycoprotein gp75, the human b (brown) locus product. *Exp Cell Res* 196(2): 233-40.
- Vijayasradhi, S., P. M. Doskoch, J. Wolchok and A. N. Houghton (1995a). Melanocyte differentiation marker gp75, the brown locus protein, can be regulated independently of tyrosinase and pigmentation. *J Invest Dermatol* 105(1): 113-9.
- Vijayasradhi, S., Y. Xu, B. Bouchard and A. N. Houghton (1995b). Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J Cell Biol* 130(4): 807-20.
- Watanabe, A., K. Takeda, B. Ploplis and M. Tachibana (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet* 18(3): 283-6.
- Winder, A., T. Kobayashi, K. Tsukamoto, K. Urabe, P. Aroca, K. Kameyama and V. J. Hearing (1994a). The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. *Cell Mol Biol Res* 40(7-8): 613-26.
- Winder, A. J., A. Wittbjør, G. Odh, E. Rosengren and H. Rorsman (1994b). The mouse brown (b) locus protein functions as a dopachrome tautomerase. *Pigment Cell Res* 7(5): 305-10.
- Wirtz, K. W. (1991). Phospholipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 60: 73-99.
- Wu, H. and H. Y. Park (2003). Protein kinase C-beta-mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 948-53.
- Wu, X., B. Bowers, K. Rao, Q. Wei and J. A. r. Hammer (1998). Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function *In vivo*. *J Cell Biol* 143(7): 1899-918.
- Wu, X., K. Rao, M. B. Bowers, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and J. A. Hammer, 3rd (2001). Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci* 114(Pt 6): 1091-100.
- Wu, X., F. Wang, K. Rao, J. R. Sellers and J. A. Hammer, 3rd (2002a). Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol Biol Cell* 13(5): 1735-49.
- Wu, X. S., K. Rao, H. Zhang, F. Wang, J. R. Sellers, L. E. Matesic, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and J. A. Hammer, 3rd (2002b). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol* 4(4): 271-8.
- Xu, Y., V. Setaluri, Y. Takechi and A. N. Houghton (1997). Sorting and secretion of a melanosome membrane protein, gp75/TRP1. *J Invest Dermatol* 109(6): 788-95.
- Xu, Y., S. Vijayasradhi and A. N. Houghton (1998). The cytoplasmic tail of the mouse brown locus product determines intracellular stability and export from the endoplasmic reticulum. *J Invest Dermatol* 110(4): 324-31.
- Yamamoto, O. and J. Bhawan (1994). Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res* 7(3): 158-69.
- Yasumoto, K., K. Yokoyama, K. Shibata, Y. Tomita and S. Shibahara (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14(12): 8058-70.

- Yasumoto, K., K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita and S. Shibahara (1997). Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem* 272(1): 503-9.
- Yokoyama, K., H. Suzuki, K. Yasumoto, Y. Tomita and S. Shibahara (1994). Molecular cloning and functional analysis of a cDNA coding for human DOPACHrome tautomerase/tyrosinase-related protein-2. *Biochim Biophys Acta* 1217(3): 317-21.
- Yokoyama, T., D. W. Silversides, K. G. Waymire, B. S. Kwon, T. Takeuchi and P. A. Overbeek (1990). Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res* 18(24): 7293-8.
- Zhao, H., Y. Zhao, J. J. Nordlund and R. E. Boissy (1994). Human TRP-1 has tyrosine hydroxylase but no dopa oxidase activity. *Pigment Cell Res* 7(3): 131-40.

ANNEXE

Original Research Article

Pheomelanin Coat Colour Dilution in French Cattle Breeds is not Correlated with the *TYR*, *TYRP1* and *DCT* Transcription Levels

SYLVAIN GUIBERT, MICHAEL GIRARDOT, HUBERT LEVEZIEL, RAYMOND JULIEN and AHMAD OULMOUDEN

Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061 INRA/Université de Limoges, Limoges, France

*Address reprint requests to Ahmad Oulmouden, Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061 INRA/Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 123 Av A. Thomas, 87060 Limoges cedex, France. E-mail: oulmouden@unilim.fr

Received 29 October 2003; in final form 27 February 2004

In this study we report the isolation of full-length cDNAs and the expression patterns of *TYR*, *TYRP1* and *DCT* in four *e/e* cattle breeds exhibiting different pheomelanin coat colours ranging from reddish brown to creamy white phenotypes. Predicted proteins encoded by bovine *TYR*, *TYRP1* and *DCT* display high levels of homology and contain all characteristic domains shared between their mouse and human counterparts. The full expression of these three genes is observed in melanocytes of black areas of *E^D/E^D* Prim'Holstein's animals. On the other hand, *e/e* melanocytes of animals belonging to the Blonde d'Aquitaine (blond), Limousine (red) and Salers

(reddish brown) breeds present different levels of down-regulated *TYR* and *DCT* expression and a complete repression of *TYRP1*. Surprisingly, *e/e* melanocytes of animals belonging to the Charolais breed (creamy white) present an inverse relationship between *TYR*, *TYRP1* and *DCT* expression and its lower melanogenic activity. The sum of these results shows that the dilution of the coat colour in French cattle breeds is not correlated with a transcription level of *TYR* family genes. Other possible modifier loci are suggested.

Key words: *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, Expression, Pheomelanin

INTRODUCTION

In mice, at least 100 genetic loci affecting pigmentation have been identified. So far, 59 have been cloned and sequenced (1). The protein products encoded by these loci are involved in different stages of melanocyte biology including melanocyte migration and development from neural crest (i.e. *Kit*, *Kitl*, *Edn3*, *Ednrb*), biosynthesis of melanin (i.e. *Tyr*, *Tyrp1*, *Dct*), control of melanogenesis (i.e. *Pomc1*, *Mclr*, *Agouti*, *Mitf*), melanosome biogenesis (i.e. *Silver*, *Pink-eyed dilution*, *Ap3*) and transport of melanosomes (i.e. *Mlph*, *Myo5a*, *Rab27a*). The biosynthesis of pigment itself is a process orchestrated by the concerted action of Tyrosinase (*TYR*), Tyrosinase-related protein-1 (*TYRP1/gp75*) and dopachrome tautomerase (*DCT/TYRP2*). They are melanocyte-specific enzymes that act to synthesize two types of pigment, eumelanin (black/brown) and/or pheomelanin (yellow/red), which are then deposited in discrete membrane-bound organelles known as melanosomes (2). These three metalloenzymes are type I

membrane glycoproteins with similar structural features but display different substrate and reaction specificities (3). *TYR* catalyses the rate-limiting reactions in melanin synthesis, converting tyrosine to DOPAquinone and subsequently oxidizing 5,6-dihydroxyindole (DHI) to indole-5,6-quinone (4). *TYRP1* and *DCT* function at downstream points in the melanin biosynthetic pathways and specify both the quantity and the quality of the melanin produced (4, 5). Additional proteins like *Pmel17* (*gp100*) (6, 7), pink-eyed dilution (8) and *MART-1* (9) are being added as molecular regulators. The eumelanin/pheomelanin ratio is directly regulated in wild-type mice by two loci, named *Extension* and *Agouti*, which encode melanocortin 1 receptor (*Mclr*), a seven pass transmembrane G protein coupled receptor, and the *Agouti* protein, respectively (10). Eumelanin synthesis is stimulated in melanocytes by the binding of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) to the *Mclr*, whereas pheomelanin

Abbreviations – α -MSH, α -melanocyte stimulating hormone; *DCT*, dopachrome tautomerase; *DHICA*, 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid; *L-dopa*, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; *Mclr*, melanocortin 1 receptor; *TYR*, tyrosinase; *TYRP1*, tyrosinase-related protein 1; *TYRPs*, tyrosinase-related proteins

synthesis is stimulated by the binding of Agouti to Mc1r (11). In mice, constitutively active *Mc1r* mutations such as dominant *Mc1r^{so}* cause eumelanin (black) pigment synthesis whereas loss-of-function mutations such as recessive *Mc1r^e* are associated with the synthesis of yellow pigment (12). Thus, the signalling steady-state of Mc1r helps to control the ratio of eumelanin to pheomelanin (13).

Regulation of melanogenesis at the transcriptional level usually involves microphthalmia-associated transcription factor (MITF), a bHLH transcription factor known as a master regulator of melanogenic gene expression (14, 15). MITF has been shown to regulate the expression of all known genes encoding melanosomal protein including *TYR* family genes (16–18). MITF itself appears to be up-regulated at transcriptional level by the binding of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) to the Mc1r (19). Thus, the transcriptional regulation of MITF by the signalling steady-state of Mc1r provides a direct mechanistic link to pigmentation. However, many melanogenic genes including *Tyr*, *Tyrp1* and *Dct* are subjected to post-transcriptional regulation and this level of regulation is also important in determining the pigmentation phenotype (20–26).

In cattle, the coat exhibits a wide range of colours and many breeds have a characteristic colour pattern. For example, all individuals belonging to Angus, Limousine and Charolais breeds have black, red and creamy white coat colours, respectively. Thus, the existence in *Bos taurus* of standardized breeds, which are homogenous in regard to coat colour, allows us to consider these breeds to be equivalent to the genetic strains of laboratory animals. We and others (27, 28) have previously identified four alleles at the *EXTENSION (MC1R)* locus. Three of them were suggested by genetics analysis (29). The most striking genotype-phenotype correlation was observed for the loss-of-function mutation found in homozygous (*e/e*) state in several breeds with different diluted pheomelanin coat colours. They include the creamy white Charolais, the red Limousine and the reddish brown Salers. The lack of direct correlation between *MC1R* genotype and phenotypic expression has also been reported in humans (30) and in domestic dogs (31). Several propositions that could explain this discrepancy have been suggested including dosage effect of *MC1R* variants, and/or variation in Agouti (31).

In this study we attempted to identify the modifier loci responsible for pheomelanin coat colour dilution in four selected bovine breeds which are homozygous *e/e* at *MC1R* (28). Three main lines of evidence allow us to suppose that such loci could act downstream of the *MC1R*. Firstly, wild type *MC1R* is absolutely required for the control of the signal transduction by α -MSH or Agouti (32). Secondly, the *e/e* genotype encodes a non-functional *MC1R* (33) suggesting that the phenotype dilution of *e/e* cattle breeds seems to occur independently of α -MSH and Agouti. Furthermore, we have shown (M. Girardot et al., unpublished data) that there are no mutations in the bovine *AGOUTI* gene coding regions that could explain this dilution phenotype. Thirdly, the four *e/e* breeds examined exhibit a uniform pheomelanin coat colour suggesting that they are not affected in loci involved in the migration and survival of melanocytes from the neural crest (10).

As a first step to elucidating the molecular mechanisms of pheomelanin dilution in cattle, we focused on the *TYR* family genes. In mice, several observations (34) but also experimental evidence show that hypomorphic mutations of tyrosinase (e.g. chinchilla) preferentially dilute pheomelanin (35). In other respects, expression analysis during the eumelanin/pheomelanin switch phase has shown that *Tyrp1* and *Dct* are completely suppressed during pheomelanogenesis, whereas expression of *Tyr* is only reduced (36).

In this study we isolated the bovine *TYR*, *TYRP1* and *DCT* genes and we examined their expression patterns. We present evidence that the expression pattern of *TYR* family genes is not correlated with pheomelanin coat colour dilution in cattle.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Five standardized breeds, homogenous with respect to coat colour (three unrelated animals per breed) were used in this study. Coat colour phenotypes (Fig. 1) were black with white spotting (Prim'Holstein), creamy white (Charolais), blond (Blonde d'Aquitaine), red (Limousine) and reddish brown (Salers). Cattle skin samples (routinely 25 cm²) were obtained from the slaughterhouse of Limoges (France) and from several UPR (Union pour la Promotion des Races Animales).

Skin RNA Extraction and cDNA Synthesis

Skin RNA was prepared as follows. Skin fatty tissue was trimmed and hairs shaved. Samples were then cut into small pieces and subjected to RNeasy Maxi Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed from 1 μ g of DNase treated skin RNA, in a total volume of 20 μ l, using 0.5 μ g oligo (dT) primer and SuperScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen SARL, Cergy, Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions. The reaction was incubated for 50 min at 42°C and then for 15 min at 70°C. cDNAs were stored at -20°C until use. We have performed cDNA preparation from three animals of each breed (15 cDNAs in total). These cDNAs were used for expression studies of *TYR* family genes (see below).

Full-Length cDNA Cloning of *TYR*, *TYRP1* and *DCT*

To isolate the full-length cDNA of bovine *TYR* family genes, we first performed RACE experiments with 5 μ g of RNA from the black area of Prim'Holstein using the SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Ozyme France, St Quentin Yvelines, France), according to the manufacturer's instructions. Consensus primers were designed on the basis of homologies between human and mouse sequences for each gene. 5' and 3' UTRs of each gene transcript were amplified by nested PCR with consensus and adaptor primers: *-RACE-5'1/UPM (Universal Primer Mix) and *-RACE-5'2/NUP (Nested Universal Primer) for the first and second amplification of 5'UTR respectively, and *-RACE-3'1/UPM and *-RACE-3'2/NUP for the first and second amplification

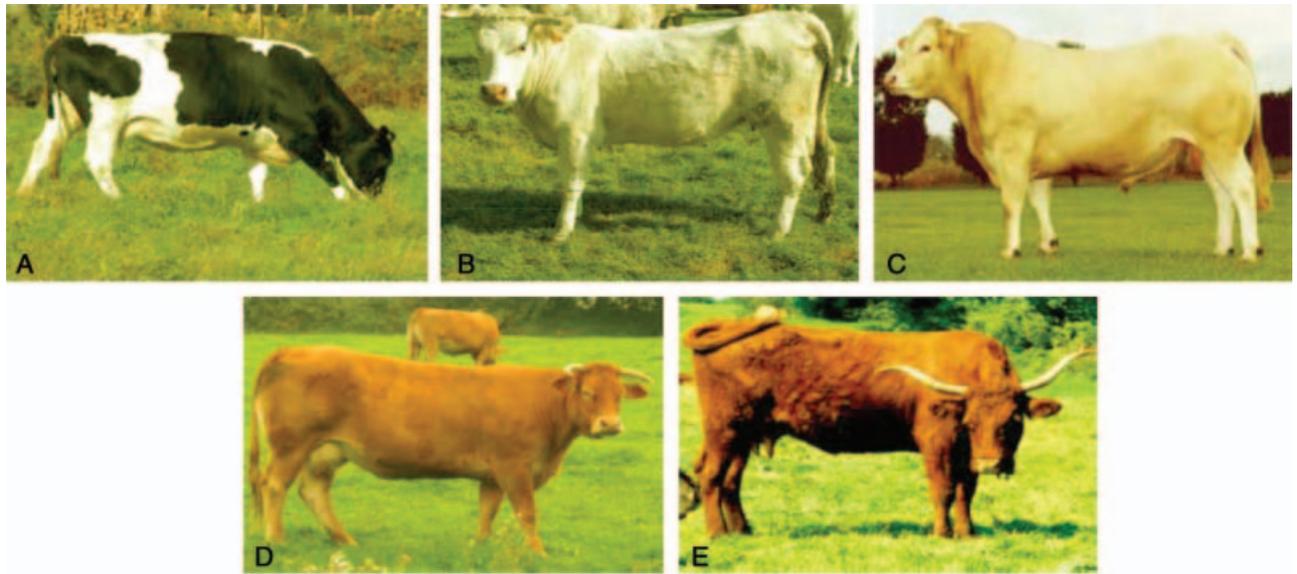


Fig. 1. Coat color phenotype of the various cattle breeds used in this study: Prim'Holstein (black with white spotting) (A), Charolais (creamy white) (B), Blonde d'Aquitaine (blond) (C), Limousine (red) (D), Salers (reddish brown) (E).

of 3'UTR respectively. * stands for *TYR*, *TYRP1* or *DCT* (Table 1). Five μ l of a 1:50 dilution of the first PCR reaction (diluted in 10 mM Tricine-KOH pH 8.5, 0.1 mM EDTA) were used as template for the second round of amplification

with nested primers. First and second PCR amplifications were carried out in a 25 μ l reaction volume containing 10 pmol of each primer and 12.5 μ l of 2X working concentration PCR Master Mix (ABgene France, Yvette

Table 1. PCR and relative quantitative real-time RT-PCR primers

Name	Sequence	Position
TYR-RACE5'1	GCTCGAGGGAAGTGGCCAGCGGAGG	132–108*
TYR-RACE5'2	CTCCACAGTAGGCAGTACAGGGCAGC	99–74
TYR-RACE3'1	CAAAACTGTTATCAATACAAAATGTAG	1777–1803
TYR-RACE3'2	TAGAAAGCCACCTGTGCTTGCTTTGC	1821–1845
TYR-5'1	TGAAAGGGAAGAGTGTGGCTCCATTAACC	2–30
TYR-5'2	CTCAGGCAGACCGTGTGAAGACCGGAGG	33–60
TYR-3'1	AGTTACTTATTACCAAATGGCATCCTTTCC	1924–1895
TYR-3'2	GAGCTTGAAGAACCCTTCGGGGAATGATC	1884–1854
TYRP1-RACE-5'1	TCTGGGCAACACACGCCATTCTCAAAGCC	267–238
TYRP1-RACE-5'2	GCACACTCTCTTGGGAACTGAGCCCAGGCC	228–199
TYRP1-RACE-3'1	TTCTGAGATTGTACCATAGCAGTAGTGG	1560–1589
TYRP1-RACE-3'2	ATCACTGGTTGCGGTCATTTTTGCGGGGCGC	1597–1626
TYRP1-5'1	TCTACGTGCCTCGGTCTACACAAAGGGC	67–96
TYRP1-5'2	CAAACCAGAAGCTGTCCTGCATTCTTGCT	99–127
TYRP1-3'1	AGTTAGTAACTCAACCTATTATTTTCTAAGC	1826–1796
TYRP1-3'2	TTATGATTCAAATGCATATGAGAATTACAC	1787–1757
DCT-RACE5'1	AGGCCAGCCAGTGTGGTGGTATCAGC	582–553
DCT-RACE5'2	GGTGGGAGTGTACTTTGCGAGGTCTAAGG	545–516
DCT-RACE3'1	CTGGCCTCGGGAGCTGGCACCCATTGGTCAC	1333–1363
DCT-RACE3'2	AGCAACAAAAGATACACCGAAGAAGCCTAG	1610–1639
DCT-5'1	AGACCAGGAGAAAGCTGGAGAGAAGCAAGG	16–45
DCT-5'2	GTGGAAGGCGAGAGAGAGTCTCCCGG	47–75
DCT-3'1	GAACACGAGGAGGCTTAATCAATCAGTATGG	1939–1909
DCT-3'2	CAGATACCACAGCTGTCATCAGCTGTACC	1898–1869
TYR-QT1	CCCTGCTCATGGAAAAGAGG	1602–1622
TYR-QT2	AGCGAGGTCAGGTTTTTTTGC	1700–1681
TYRP1-QT1	ACTGCTCCAGACAACCTGGG	1499–1518
TYRP1-QT2	GCTATGGTGACAATCTCAGAAATGC	1581–1557
DCT-QT1	TGGTTGCTTTTTTGCATTGC	1527–1547
DCT-QT2	TCTTTTGTGCTTAGCTGTGTCTCC	1621–1597
GAPDH-QT1	GTGAAGCAGGCGTCAGAGG	748–766
GAPDH-QT2	TTGAAGTCGCAGGAGACAACC	824–804

*Numbered accordingly to sequence NM_181001 (*TYR*), NM_174480 (*TYRP1*), AY278108 (*DCT*) and U85042 (*GAPDH*).

Courtaboeuf, France) in the following cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 30 cycles (96°C for 30 s, 61°C for 30 s, 72°C for 2 min) and one cycle (72°C for 5 min). PCR products were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen SARL) and sequenced (ABI Prism 310 DNA Genetic Analyzer, Perkin-Elmer France, Courtaboeuf, France). 5' and 3' end sequences for each gene were determined and used to design specific primers to amplify by nested PCR the coding region of each gene. Specific primers are *5'1/*3'1 (outer sense/outer antisense) and *5'2/*3'2 (nested sense/nested antisense). * stands for *TYR*, *TYRP1* or *DCT* (Table 1). The first and second amplifications were carried out as described above. PCR products of each gene were cloned into pCR2.1 vector (Invitrogen SARL) and sequenced. Combined sequences obtained by RACE experiments and the amplification of coding region allowed us to establish the full-length cDNAs for each gene.

Relative Quantitative Real-Time RT-PCR

Samples from three unrelated animals per breed (15 samples in total) were tested. Three independent cDNA syntheses were performed on each skin sample (45 cDNAs in total) as described above. Measurements of mRNA levels were performed with relative quantitative real-time RT-PCR using a GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer France). 1/25 of each cDNA was amplified in triplicate in 1X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems France, Courtaboeuf, France) using 7.5 pmol of forward primer (*-QT1) and 7.5 pmol of reverse primer (*-QT2) in a 25 µl volume, where * stands for *TYR*, *TYRP1* or *DCT* (Table 1). Amplification conditions were: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. A Ct value (starting cycle for amplification) was calculated by fixing a threshold in the linear portion of each amplification. The bovine *GAPDH* housekeeping gene was used to normalize the samples. Primers used to amplify cDNA of *GAPDH* are indicated (Table 1). All results are represented considering that the Prim'Holstein's black area sample represents an expression level of 1.

RESULTS

Isolation of Full-Length cDNA for *TYR*, *TYRP1* and *DCT*

TYR family cDNAs synthesis were performed with the transcripts prepared from Prim'Holstein's black areas. Combined sequences obtained by RACE experiments and the amplification of coding region allowed us to establish the full-length cDNAs for each gene. Transcripts of bovine *TYR* (2056 bp), *TYRP1* (1828 bp) and *DCT* (1974 bp) encode predicted proteins of 530, 537 and 517 amino acid residues, respectively (Fig. 2). Bovine *TYR* family enzymes share more than 90% of homologies with their human and murine counterparts.

Features of Bovine *TYR*, *TYRP1* and *DCT*

Sequence comparisons of bovine *TYR*, *TYRP1* and *DCT* revealed that these proteins share many common structural

features with their human and murine *TYR* family counterparts (Fig. 2). They displayed a N-terminal signal sequence, an epidermal growth factor like motif (EGF-like) and other conserved Cys residues that may be involved in protein-protein interactions, two metal binding domains A and B (CuA and CuB) which are catalytic sites, a C-terminal transmembrane domain with a short cytoplasmic tail and several potential glycosylation sequons. CuA has the H-x(21)-H-x(8)-H motif in *TYR* and H-x(22)-H-x(8)-H motif in *TYRP1* and *DCT* (Fig. 2). CuB has the H-x(3)-H-x(22)-H motif for the three enzymes (Fig. 2). CuA and CuB involved in metal binding were similar in *TYR* and *TYRPs* in the three species, but a higher conservation was observed for the CuB site. Both contained three conserved His residues bound to divalent cation. A Ser residue, at position 528 in *TYR*, is a potential phosphorylation site.

Expression of Bovine *TYR* Family Genes

Expression of *TYR* family genes was first examined by RT-PCR using bovine skin RNAs prepared from each breed. We found that transcripts of *TYR* and *DCT* were detected in all samples tested (Fig. 3). *TYRP1* transcripts were present in the black area of Prim'Holstein's skin, in the skin of Charolais but remained undetectable in Blonde d'Aquitaine, Limousine and Salers skins (Fig. 3).

Variation of *TYR*, *TYRP1* and *DCT* Expression

To get more insight into transcript levels of *TYR* family genes in skins of bovine breeds with different pheomelanin coat colours compared with those obtained in eumelanin areas of Prim'Holstein, we used relative quantitative real-time RT-PCR. Whatever the coat colour phenotype (eumelanin or pheomelanin), *TYR* was expressed in the skin of all breeds (Fig. 4A). As expected, the greatest expression was observed in the black areas of Prim'Holstein's skin. In the skin of all other breeds, *TYR* was under-expressed in a variable manner ranging from 0.33 in Charolais to 0.03 in Limousine (Fig. 4A).

The greatest expression of *TYRP1* was also obtained in the black area of Prim'Holstein's skin (Fig. 4B) and remained undetectable in pheomelanin animals (Blonde d'Aquitaine, Limousine, and Salers). Unexpectedly, a slight *TYRP1* transcript level (0.04) was observed in Charolais's skin (Fig. 4B).

Unlike *TYRP1*, *DCT* transcripts were detectable in the skin of all breeds (Fig. 4C). Once again, the greatest expression was observed in the Prim'Holstein's skin. The expression of *DCT* is significantly down-regulated (under the 0.5 threshold) in Salers (0.27) and Limousine (0.12) whereas levels in Charolais (0.66) and Blonde d'Aquitaine (0.62) are significantly (up than the 0.5 threshold) expressed (Fig. 4C).

DISCUSSION

In this study, we report the isolation of full-length cDNA sequences, and expression patterns of *TYR*, *TYRP1* and *DCT* in cattle. Predicted proteins of bovine *TYR*, *TYRP1* and *DCT* contain all characteristic domains shared between

A

TYR <i>bos</i>	<u>MLLAALYCLLWSFRTSAGHFPRACASSKSLTEKECCPPWAGDGSPCGRLSGRGSCQDVIL</u>	60
TYR <i>homo</i>	----V-----Q-----V---N-M-----S--R---Q-----NIL-	60
TYR <i>mus</i>	-F--V-----QI-D-----N-LA-----M-----Q-----IL-	60
TYR <i>bos</i>	STAPLGPQFPFTGVDDRESWPSIFYN <u>RTCQCF</u> SNFMGFN <u>CGSCK</u> FGFRGPRCTERRLLVR	120
TYR <i>homo</i>	-N-----V-----SG-----N----W-- <u>N</u> -----	120
TYR <i>mus</i>	-S--S-----K-----V-----SG-----N----G-- <u>N</u> ---K-V-I-	120
TYR <i>bos</i>	RNIFDLSVPEKNKFLAYLTLAKHTTSPDYVIPTGTYGQMNHGTTPLFNDVSAIDLFWVMH	180
TYR <i>homo</i>	-----A--D--F-----I-S----I----- <u>KN</u> -S--M--INI-----	180
TYR <i>mus</i>	-----S-----FS-----I-SV---T----- <u>N</u> -S--M--INI-----	180
TYR <i>bos</i>	YYVSRD ¹ TL ² LG ³ DSEVWRDIDFA <u>HEAPGFLPW</u> HRLFLLLWEQEIQKLTGDEN <u>FTIPYD</u> WWRD	240
TYR <i>homo</i>	---M-A--G--I-----A-----R-----	240
TYR <i>mus</i>	-----G--I-----RE-----V-----	240
TYR <i>bos</i>	AEN <u>CDV</u> CTDEYMGGRNPANPNLLSPASFFSSWQIV <u>CSR</u> LEEYNSRQAL <u>CNG</u> TSEGPLLRN	300
TYR <i>homo</i>	--K--I-----QH-T-----H-S-----P---R--	300
TYR <i>mus</i>	-----I-----L---H-E-----I---S-----H-V--D--P-----	300
TYR <i>bos</i>	PGNHDKARTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSM <u>DKAAN</u> FSFRNTLEGFADPVTGIADASQS	360
TYR <i>homo</i>	-----S-----S-L-----	360
TYR <i>mus</i>	-----K-----RT-----V--S-L-----P---	360
TYR <i>bos</i>	SMH <u>NALHI</u> YM <u>NG</u> TMSQVPGSANDPIFL <u>LLH</u> HAFVDSIFEQWLRKYHPLQDVYPEANAPIGH	420
TYR <i>homo</i>	-----Q-----RHR---E-----	420
TYR <i>mus</i>	-----F-----Q-----RHR--LE-----	420
TYR <i>bos</i>	NRESYMPFIPLYRNGDFFISSKDL <u>GYDY</u> SYLQDSEPDIFQDYIKPYLEQAQRIWPWLIG	480
TYR <i>homo</i>	-----D--SF-----S---S--L-	480
TYR <i>mus</i>	--D-----T-----E-D-GFYRN--E-----S-----L-	480
TYR <i>bos</i>	AAVVGSVLTAVLGGLTSLLC===RRKRNQLPEEKQPLLMEKEDYHNL <u>MYQ</u> SHL	530
TYR <i>homo</i>	--M--A---L-A--V-----H--K-----S-----	529
TYR <i>mus</i>	--L--A-IA-A-S--S-R--LQKKK-KK-PQ--R-----D-D--S-L-----	533

Fig. 2. Alignment of bovine, human and mouse protein sequences of tyrosinase (A), TYRP1 (B) and DCT (C). Accession numbers are AAL38168, P14679, P11344 for bovine, human and murine TYR, respectively; AAL38167, P17643, P07147 for bovine, human and murine TYRP1, respectively, and AAP33051, P40126, P29812 for bovine, human and murine DCT, respectively. The methionine corresponding to the initiation codon is assigned to residue 1. Amino acid sequence identities and deletions are indicated by dashed lines and double-dashed lines, respectively. The signal peptide is single underlined. Conserved cysteines, N-glycosylation sites and histidines involved in metal ligand-binding are double-underlined. Residues located far away from the active site and probably important for maintaining the globular structure are shown in bold.

their human and murine counterparts (Fig. 2). The signal peptide that targets the nascent polypeptides to the endoplasmic reticulum is conserved in *TYR* family genes (Fig. 2). The signal peptide cleavage site between 18G and 19H is conserved in TYR (Fig. 2A). Bovine TYR is likely to be glycosylated since most of the glycosylation sequons are conserved. It is interesting to notice that the N111 site, unoccupied in mouse (37), is missing in cattle. Both CuA and CuB regions contain three conserved His residues, predicting that TYR and DCT are able to bind copper and zinc, respectively (38, 39). The nature of the metal bound to TYRP1 is yet mostly unknown (38). The additional fourth His centred between the first His pair and the last His in CuB motif of TYRP1 and DCT is conserved in the three species. In TYR the corresponding central His is replaced in bovine

by P378 and by Q378 in human and mouse (Fig. 2A). It has been shown that the replacement of Q (in TYR) by H (in TYRPs) greatly reduces the affinity for L-DOPA which is consistent with the low/null tyrosinase activity of the TYRPs (40). The effect of the substitution of Q378 by P378 on bovine TYR activity remains to be determined. The sophisticated signals contained in the C-terminal region of the TYR family are conserved in the three species. They include the di-leucine motif shared by TYR and TYRP1 (Fig. 2A and B), and the tyrosine-based motif shared by the three enzymes. Both motifs seem to be involved in TYR and TYRP1 sorting to the melanosome whereas tyrosine-based motif should be involved in targeting DCT as it is devoid of the di-leucine motif (3). Other elements including cysteine clusters and N-glycosylation sites are found in the TYR family of the three

B

```

TYRP1 bos   MKSPTLLSLGYMFLVLLFFQOAWAQFPRECATIEALRNGVCCPDLSPLSGPGSDRCGLSS 60
TYRP1 homo  -SAPK-----CI-FP--L----R-----Q--V----S-M-----V----T----S-- 60
TYRP1 mus   ---YNV-P-AYIS-F-ML-Y-V-----NI----R-V-----L-S----T-P--S-- 60

TYRP1 bos   GRGRCEVVIADSRPHSHHYPHDGRDDREGWPTRSFNRTCHCNGNFSGHNCGTUCRPGWGGA 120
TYRP1 homo  -----A-T-----PQ-----V--L-F-----R-- 120
TYRP1 mus   -----VA-----R-----K---A--L-F-----Q--D-----R-- 120

TYRP1 bos   ACDQQRVLTVRRNLLDLSTEEKNRFVRAULDMAKRTTHPQFVIATRRSEEILGPDGNTPOFE 180
TYRP1 homo  -----I-----K---H-----L----- 180
TYRP1 mus   --N-KI-----P--SH-----L-D----- 180

TYRP1 bos   NISIIYNYFVWTHYYSVKKKTFULUGAGQESFGEVDFSHUEGPAFLTWHRYHLLQLERDMQEMLQ 240
TYRP1 homo  -----V-----R--K----- 240
TYRP1 mus   ---V-----T-----D----- 240

TYRP1 bos   DPSFSLPYWNFATGKNTCDICTDDLUMGSRSNFDSTLISPNSVFSQWRVVCESLEDYDTLG 300
TYRP1 homo  E-----V-----D----- 300
TYRP1 mus   E-----V--V-----E----- 300

TYRP1 bos   TLCNUSTEGGPIKRNPAUGNVARPMVQRLPKPQDVAQCLEVGSYDTPPFYSNUSTNSFRNTVE 360
TYRP1 homo  -----D--R-----E-----LF----- 360
TYRP1 mus   -----R-----G--A-----E---T-----RVF-----D----- 360

TYRP1 bos   GYSHPTGRYDPAVRSLHNLUAHLFLUNGTGGQTHLSPNDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNA 420
TYRP1 homo  ---D--K----- 420
TYRP1 mus   ---A--K----- 420

TYRP1 bos   DISTYPLENAPIGHNRQYNMVPFUWPPVTNIEMFVTAPDNLGYTYEVQWPSRSFSISEIVT 480
TYRP1 homo  ----F-----T-----I-----E--VP--IA 480
TYRP1 mus   ----F-----T-----A-----GQE-TV---I- 480

TYRP1 bos   IAVVAALSLVAVIFAGASCLIRARSNMDEANQPLLTDQYQHYIEEYEKIHNPNQSVV 537
TYRP1 homo  ---G--L--L--GT--Y-----RS-----C-A-----LQ----- 537
TYRP1 mus   -----L--A--GV-----S-STKN-----H--R-A-D--ELP---H-M- 537

```

Fig. 2. Continued

species (Fig. 2). The two serines in TYR at positions 523 and 527 are phosphorylated in human (41). Only the last one, located at position 528, is conserved in cattle. The possible phosphorylation of S528 and its implication in TYR activation remain to be determined. All together, these features suggest that bovine TYR family enzymes possess all the important features necessary to be folded, matured, glycosylated and sorted like active enzymes in the melanosome.

We have investigated the steady-state of TYR family genes expression. As assessed by RT-PCR (Fig. 3), TYR is expressed in melanocytes of all breeds, which is consistent with its role in the synthesis of both eumelanin and pheomelanin (36). DCT expression is also detectable in melanocytes from all breeds. Bovine TYRP1 seems to be implicated exclusively in black eumelanin synthesis since no expression is observed for pheomelanin animals except those belonging to the Charolais breed (see below). These results notably highlight the differences in the regulation of bovine TYRP1 and, TYR and DCT. In this respect, it has been

reported that TYRP1 in melanocytes and melanoma can be regulated independently of tyrosinase (42, 43).

To get more insight in expression levels of TYR family genes, we used relative quantitative real-time RT-PCR to compare their expressions in *e/e* animals exhibiting different pheomelanin phenotypes and those obtained in black areas of *E^D/E^D* animals. As expected, the highest expression of TYR, TYRP1 and DCT was obtained in black skin areas of Prim'Holstein (Fig. 4). This result is in agreement with previous data showing that the *E^D/E^D* melanocytes of Prim'Holstein's black areas were very strongly eumelanogenic and that black hair samples contained more eumelanin than pheomelanin (44). The constitutively active MC1R encoded by *E^D* allele (33) is in fact responsible for the up-regulation of TYR family genes through the cyclic AMP pathway and, therefore explains eumelanin coat colour phenotype of Prim'Holstein's black area. On the other hand, *e/e* melanocytes of Charolais, Blonde d'Aquitaine, Limousine and Salers present a down-regulated expression of TYR,

C

DCT	<i>bos</i>	<u>M</u> S <u>P</u> L <u>G</u> W <u>G</u> L <u>L</u> L <u>G</u> C <u>L</u> G <u>C</u> A <u>L</u> P <u>S</u> G <u>A</u> R <u>A</u> Q <u>F</u> P <u>R</u> V <u>C</u> M <u>T</u> V <u>G</u> S <u>L</u> Q <u>A</u> K <u>E</u> <u>C</u> C <u>P</u> P <u>L</u> G <u>A</u> D <u>P</u> A <u>N</u> V <u>C</u> G <u>S</u> R <u>E</u> G <u>R</u> G <u>Q</u>	60
DCT	<i>homo</i>	---W--F--S---KILP--QG-----D--VN-----R---ES-----QQ----	60
DCT	<i>mus</i>	-GLV-----GILLR-----LDGVLN-----PEAT-I--FL-----	60
DCT	<i>bos</i>	<u>C</u> A <u>E</u> V <u>Q</u> T <u>D</u> T <u>R</u> P <u>W</u> S <u>G</u> P <u>Y</u> V <u>L</u> R <u>N</u> Q <u>D</u> D <u>R</u> E <u>R</u> W <u>P</u> R <u>K</u> F <u>F</u> D <u>R</u> T <u>C</u> R <u>C</u> T <u>G</u> N <u>F</u> A <u>G</u> Y <u>N</u> C <u>G</u> N <u>C</u> R <u>F</u> G <u>W</u> T <u>G</u> P <u>K</u> C <u>D</u> Q	120
DCT	<i>homo</i>	-T--RA-----I-----L-----H---K-----D-K-----N-ER	120
DCT	<i>mus</i>	-----I-----Q-----N---K-----G-K-----D-NR	120
DCT	<i>bos</i>	K <u>K</u> P <u>L</u> V <u>V</u> R <u>R</u> D <u>V</u> H <u>S</u> L <u>T</u> P <u>Q</u> E <u>R</u> E <u>Q</u> F <u>L</u> D <u>A</u> L <u>D</u> L <u>A</u> K <u>Y</u> T <u>P</u> H <u>P</u> D <u>Y</u> V <u>I</u> T <u>T</u> Q <u>H</u> W <u>L</u> G <u>L</u> L <u>G</u> P <u>N</u> G <u>T</u> Q <u>P</u> Q <u>I</u> A <u>N</u> C <u>S</u>	180
DCT	<i>homo</i>	---P-I-QNI---SP-----G-----KRV-----F----	180
DCT	<i>mus</i>	---AIL--NI---A-----G-----KSI-----	180
DCT	<i>bos</i>	I <u>Y</u> D <u>F</u> F <u>V</u> W <u>L</u> <u>H</u> Y <u>S</u> V <u>R</u> D <u>T</u> L <u>L</u> G <u>P</u> G <u>R</u> P <u>Y</u> K <u>A</u> I <u>D</u> F <u>S</u> H <u>Q</u> G <u>P</u> A <u>F</u> V <u>T</u> W <u>H</u> R <u>Y</u> H <u>L</u> L <u>W</u> L <u>E</u> R <u>D</u> L <u>Q</u> R <u>L</u> T <u>G</u> N <u>E</u> S <u>F</u>	240
DCT	<i>homo</i>	V-----R-----C-----I-----	240
DCT	<i>mus</i>	V-----E-----	240
DCT	<i>bos</i>	<u>A</u> L <u>P</u> Y <u>W</u> N <u>F</u> A <u>T</u> G <u>R</u> N <u>E</u> C <u>D</u> V <u>C</u> T <u>D</u> Q <u>L</u> L <u>G</u> A <u>A</u> R <u>Q</u> D <u>D</u> P <u>T</u> L <u>I</u> S <u>Q</u> N <u>S</u> R <u>F</u> S <u>S</u> W <u>E</u> I <u>V</u> C <u>D</u> S <u>L</u> N <u>D</u> Y <u>N</u> R <u>R</u> V <u>T</u> L <u>C</u> N	300
DCT	<i>homo</i>	-----F---P-----R-----T-----D---HL-----	300
DCT	<i>mus</i>	-----K-----DW-----R-----T-----D-----	300
DCT	<i>bos</i>	G <u>T</u> Y <u>E</u> G <u>L</u> L <u>K</u> R <u>N</u> Q <u>M</u> G <u>R</u> N <u>S</u> E <u>K</u> L <u>P</u> T <u>L</u> K <u>D</u> I <u>Q</u> N <u>C</u> L <u>S</u> L <u>K</u> K <u>F</u> D <u>S</u> P <u>P</u> F <u>F</u> Q <u>N</u> S <u>T</u> L <u>S</u> F <u>R</u> N <u>A</u> L <u>E</u> G <u>F</u> G <u>K</u> A <u>D</u> G <u>T</u>	360
DCT	<i>homo</i>	-----R-----M-----RD---Q---N-----F-----D-----	360
DCT	<i>mus</i>	-----R--KV---N-----NV-D---Q-----F-----D-----	360
DCT	<i>bos</i>	L <u>D</u> S <u>Q</u> V <u>M</u> N <u>F</u> H <u>N</u> L <u>V</u> H <u>S</u> F <u>L</u> N <u>G</u> T <u>S</u> A <u>L</u> P <u>H</u> S <u>A</u> A <u>N</u> D <u>P</u> V <u>F</u> V <u>V</u> L <u>H</u> S <u>F</u> T <u>D</u> A <u>I</u> F <u>D</u> E <u>W</u> M <u>K</u> R <u>F</u> N <u>P</u> P <u>V</u> D <u>A</u> W <u>P</u> R <u>E</u>	420
DCT	<i>homo</i>	-----S <u>L</u> ---V-----N-----I-----M--F--PA---Q-	420
DCT	<i>mus</i>	-----NL---A-----N-----V-----L--N--ST---Q-	420
DCT	<i>bos</i>	L <u>A</u> P <u>I</u> G <u>H</u> N <u>R</u> M <u>Y</u> N <u>M</u> V <u>P</u> F <u>F</u> P <u>P</u> V <u>T</u> N <u>E</u> E <u>L</u> F <u>L</u> T <u>A</u> D <u>Q</u> L <u>G</u> Y <u>S</u> Y <u>A</u> I <u>D</u> L <u>P</u> ==V <u>E</u> E <u>T</u> P <u>D</u> W <u>T</u> T <u>V</u> L <u>S</u> V <u>V</u> T <u>G</u> M <u>L</u>	478
DCT	<i>homo</i>	-----S-----VS-----G-P-T-L--M-T-	480
DCT	<i>mus</i>	-----E---N--V--S==E--A-V-S-T---I-I-	478
DCT	<i>bos</i>	V <u>V</u> L <u>V</u> V <u>L</u> F <u>A</u> L <u>L</u> L <u>F</u> L <u>Q</u> Y <u>R</u> R <u>L</u> R <u>K</u> G <u>Y</u> T <u>P</u> L <u>V</u> E <u>T</u> Q <u>L</u> S <u>N</u> K <u>R</u> Y <u>T</u> E <u>E</u> A	517
DCT	<i>homo</i>	-A--G--V--A-----M--H--S-----	519
DCT	<i>mus</i>	G <u>A</u> F-L-LG--A-----A--M--G--S-----	517

Fig. 2. Continued

TYRP1 and *DCT*. The *e/e* genotype leads to the synthesis of a truncated receptor, insensitive to α -MSH and Agouti (33), uncoupled from adenylate cyclase and thus unable to signal. Thus, the *e/e* genotype is associated with down-regulated expression of *TYR* family genes and therefore is responsible for the pheomelanin coat colour (36). Taken together, these results show that the relationship of bovine *TYR* family genes expression to the MC1R signalling steady-state, associated with *e* (loss-of-function) or *E^D* (gain-of-function) alleles and ultimately the type of melanin produced, is similar to previous data reported in mouse carrying *e/e* or *E^{so}/E^{so}* genotypes (12). At this stage of the study, we have yet no further evidence that could explain unexpected variable expressions of *TYR* and *DCT* (Fig. 4A and C). The undetectable *TYRP1* expression as assessed by RT-PCR and relative quantitative real-time RT-PCR (Fig. 3 and 4B) characterized Blonde d'Aquitaine, Limousine and Salers breeds. However, the complete absence of *TYRP1* expression is not sufficient to account for the diluted colours ranging

from reddish brown (Salers), red (Limousine) to blond (Blonde d'Aquitaine).

The most striking result revealed by our work was obtained in melanocytes of creamy white Charolais. Although the expression of *TYRP1* is highly down-regulated (Fig. 4B), it is not completely absent, as observed in other *e/e* breeds. Furthermore, *TYR* and *DCT* present more expression in Charolais compared with other *e/e* breeds (Fig. 4A and C). On the other hand, biochemical investigations of melanin hair contents showed that Charolais had lower melanogenic activity than Limousine (44).

Altogether, our data show that there is no correlation between *TYR* family gene expression and pheomelanin coat colour dilution in the four cattle breeds selected (Fig. 1). We have also screened the coding regions of bovine *TYR* family genes in three animals belonging to each breed (15 animals in total) without finding any polymorphism associated with a given pheomelanin coat colour (data not shown). At this stage of the study, we have yet no further evidence about

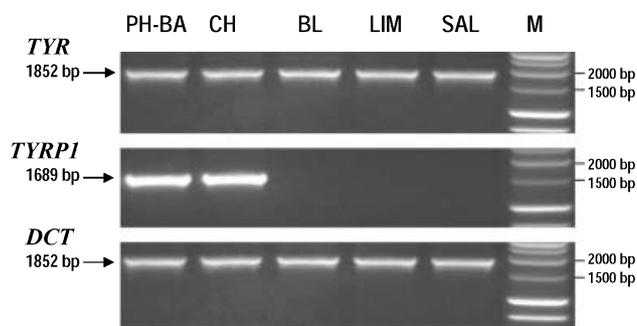


Fig. 3. Amplification of *TYR*, *TYRP1* and *DCT* transcripts. Amplification of coding region on each gene was conducted as described in materials and methods on cDNA from different cattle breeds: black area of Prim'Holstein (PH-BA), Charolais (CH), Blonde d'Aquitaine (BL), Limousine (LIM) and Salers (SAL). M: DNA ladder. Expected length are obtained.

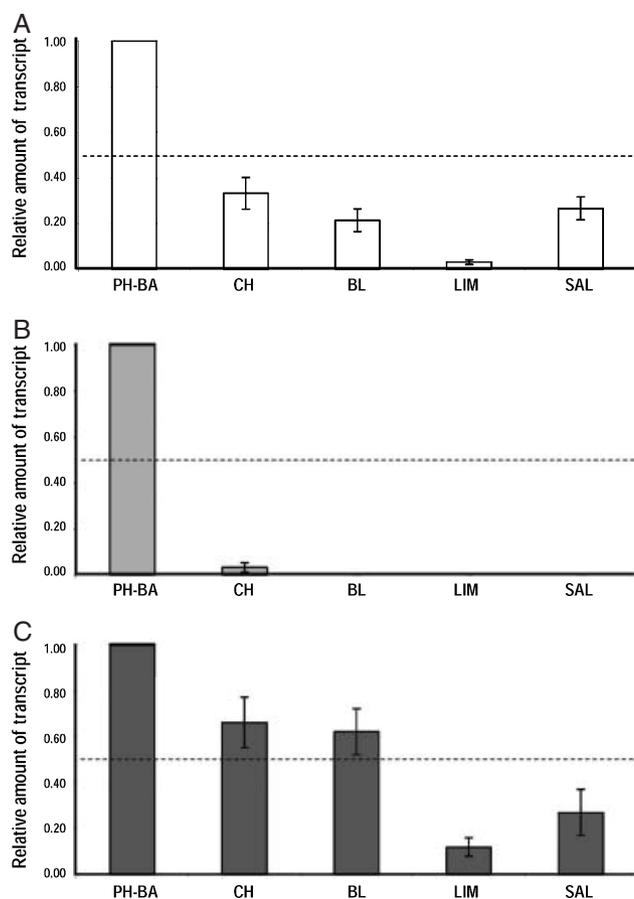


Fig. 4. Relative amounts of *TYR*, *TYRP1* and *DCT* transcripts determined by relative quantitative real-time RT-PCR in different breeds. Breeds studied are Prim'Holstein (black area, PH-BA), Charolais (CH), Blonde d'Aquitaine (BL), Limousine (LIM) and Salers (SAL). 0.5 expression threshold is indicated by a dashed line. Expressions are indicated by a white bar, a grey bar and a black bar respectively for *TYR*(A), *TYRP1* (B) and *DCT* (C). The Prim'Holstein was used as a reference (expression level of 1.0). Standard deviation bars represent variation between three animals tested of each breed.

modifier loci responsible for this pheomelanin coat colour dilution. However, the inverse relationship between *TYR*, *TYRP1* and *DCT* expression in Charolais melanocytes and their lower melanogenic activity (creamy white) suggest that a modifier gene responsible for the extreme coat colour dilution (creamy white) in Charolais mediates conditions unfavourable for *TYR*, *TYRP1* and/or *DCT* activities within the melanosome. In this respect, a number of mutations affecting other loci than *TYR* family genes have been associated with lighter coat colour. Among them, mutations at genes encoding proteins involved in the processing and targeting of *TYR*, *TYRP1* and *TYRP2* enzymes to the melanosome as well as those encoding proteins involved in the melanosome biogenesis could be relevant (1, 45).

Acknowledgements – We would like to thank the bovine UPRA's (Unités pour la sélection et la promotion des races bovines françaises), France UPRA Sélection and Labogena (Jouy-en-Josas) for providing blood and skin samples. We thank Dr Valérie Amarger for the helpful suggestions and critical reading of the manuscript. We thank Marie-Pierre Laforêt and Lionel Forestier for their technical assistance. This work was supported by MJENR, MENRT, and INRA grants.

REFERENCES

- Bennett DC, Lamoreux ML. The color loci of mice—a genetic century. *Pigment Cell Res* 2003;16:333–344
- Kushimoto T, Valencia JC, Costin GE, Toyofuku K, Watabe H, Yasumoto K, Rouzaud F, Vieira WD, Hearing VJ. The Seiji memorial lecture: the melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Res* 2003;16:237–244
- Garcia-Borron JC, Solano F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* 2002;15:162–173
- Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 2000;13(Suppl. 8):103–109
- Lamoreux ML, Wakamatsu K, Ito S. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res* 2001;14:23–31
- Chakraborty AK, Platt JT, Kim KK, Kwon BS, Bennett DC, Pawelek JM. Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by the pmel 17/silver locus protein. *Eur J Biochem* 1996;236:180–188
- Lee ZH, Hou L, Moellmann G, Kuklinksa E, Antol, K, Fraser M, Halaban R, Kwon, BS. Characterization and subcellular localization of human Pmel 17/silver, a 110-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J Invest Dermatol* 1996;106:605–610
- Brilliant MH. The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res* 2001;14:86–93
- Butterfield LH, Stoll TC, Lau R, Economou JS. Cloning and analysis of MART-1/Melan-A human melanoma antigen promoter regions. *Gene* 1997;191:129–134
- Barsh GS. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 1996;12:299–305
- Furumura M, Sakai C, Potterf SB, Vieira WD, Barsh GS, Hearing VJ. Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7374–7378
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehffuss L, Baak E, Mountjoy KG, Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 1993;72:827–834
- Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:117–133
- Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000;13:60–69
- Tachibana M. MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res* 2000;13:230–240

16. Halaban R, Bohm M, Dotto P, Moellmann G, Cheng E, Zhang Y. Growth regulatory proteins that repress differentiation markers in melanocytes also downregulate the transcription factor microphthalmia. *J Invest Dermatol* 1996;106:1266–1272
17. Yavuzer U, Keenan E, Lowings P, Vachtenheim J, Currie G, Goding CR. The microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein in vitro and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription. *Oncogene* 1995;10:123–134
18. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 2003;163:333–343
19. Price ER, Horstmann MA, Wells AG, Weilbaecher KN, Takemoto CM, Landis MW, Fisher DE. α -Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem* 1998;273:33042–33047
20. Halaban R, Cheng E, Svedine S, Aron R, Hebert DN. Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J Biol Chem* 2001;276:11933–11938
21. Burchill SA, Bennett DC, Holmes A, Thody AJ. Tyrosinase expression and melanogenesis in melanotic and amelanotic B16 mouse melanoma cells. *Pathobiology* 1991;59:335–339
22. Fuller BB, Iman DS, Lunsford JB. Comparison of tyrosinase levels in amelanotic and melanotic melanoma cell cultures by a competitive enzyme-linked immunoadsorbent assay and by immunotitration analysis. *J Cell Physiol* 1988;134:149–154
23. Iozumi K, Hoganson GE, Pennella R, Everett MA, Fuller BB. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 1993;100:806–811
24. Huizing M, Sarangarajan R, Strovel E, Zhao Y, Gahl WA, Boissy RE. AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol Biol Cell* 2001;12:2075–2085
25. Hirosaki K, Yamashita T, Wada I, Jin HY, Jimbow K. Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require Rab7 for their intracellular transport. *J Invest Dermatol* 2002;119:475–480
26. Ancans J, Tobin DJ, Hoogduijn MJ, Smit NP, Wakamatsu K, Thody AJ. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res* 2001;268:26–35
27. Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 1995;6:636–639
28. Rouzaud F, Martin J, Gallet PF, Delourme D, Goulemot-Leger V, Amigues Y, Menissier F, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A. A first genotyping assay based on a new allele of the *extension* gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mclr). *Genet Sel Evol* 2000;32:511–520
29. Wright S. Color inheritance in mammals. VI. Cattle. *J Hered* 1917;8:521
30. Box NF, Wyeth JR, O’Gorman LE, Martin NG, Sturm RA. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* 1997;6:1891–1897
31. Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG, Jackson IJ, Barsh GS. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm Genome* 2000;11:24–30
32. Abdel-Malek ZA, Scott MC, Furumura M, Lamoreux ML, Ollmann M, Barsh GS, Hearing VJ. The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *J Cell Sci* 2001;114:1019–1024
33. Graphodatskaya D, Joerg H, Stranzinger G. Molecular and pharmacological characterisation of the MSH-R alleles in Swiss cattle breeds. *J Recept Signal Transduct Res* 2002;22:421–430
34. Silvers W. *The Coat Colors of Mice*. New York: Springer-Verlag; 1979
35. Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD, Barsh GS. Interaction of agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev* 1998;12:316–330
36. Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J Cell Sci* 1995;108:2301–2309
37. Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu AJ, Garman EF, Platt FM, Wormald MR, Dwek RA, Petrescu SM. Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J Biol Chem* 2000;275:8169–8175
38. Furumura M, Solano F, Matsunaga N, Sakai C, Spritz RA, Hearing VJ. Metal ligand-binding specificities of the tyrosinase-related proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:579–585
39. Solano F, Martinez-Liarte JH, Jimenez-Cervantes C, Garcia-Borron JC, Lozano JA. Dopachrome tautomerase is a zinc-containing enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:1243–1250
40. Olivares C, Garcia-Borron JC, Solano F. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 2002;41:679–686
41. Park HY, Perez JM, Laursen R, Hara M, Gilchrist BA. Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1999;274:16470–16478
42. Vijayaradhhi S, Doskotch PM, Wolchok J, Houghton AN. Melanocyte differentiation marker gp75, the brown locus protein, can be regulated independently of tyrosinase and pigmentation. *J Invest Dermatol* 1995;105:113–119
43. Fang D, Tsuji Y, Setaluri V. Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3096–3106
44. Renieri C, Ceccarelli P, Gargiulo AM, Lauvergne JJ, Monacelli G. Chemical and electron microscopic studies of cattle (*Bos taurus*) with four types of phenotypic pigmentation. *Pigment Cell Res* 1993;6:165–170
45. Nakamura M, Tobin DJ, Richards-Smith B, Sundberg JP, Paus R. Mutant laboratory mice with abnormalities in pigmentation: annotated tables. *J Dermatol Sci* 2002;28:1–33