

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/Université de Limoges,
Génétique Moléculaire Animale

Année : 2005

Thèse N° 23-2005

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présenté et soutenue publiquement par

Michael GIRARDOT

Le 8 Juillet 2005

Génétique moléculaire de la coloration

Découverte d'un allèle A^{br} du gène *Agouti* responsable de la bringeure de la race bovine Normande.

Directeur de Thèse : Ahmad OULMOUDEN

Jury :

Rapporteurs :	M ^{me} Michèle TIXIER-BOICHARD	Directeur de Recherche, INRA
	M ^r Daniel VAIMAN	Directeur de Recherche, INRA
Examineurs :	M ^r Carlo RENIERI	Professeur, Université de Camerino
	M ^r Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherche, INRA
	M ^r Raymond JULIEN	Professeur, Université de Limoges
	M ^r Ahmad OULMOUDEN	Maître de Conférences, Université de Limoges

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/Université de Limoges,
Génétique Moléculaire Animale

Année : 2005

Thèse N° 23-2005

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présenté et soutenue publiquement par

Michael GIRARDOT

Le 8 Juillet 2005

Génétique moléculaire de la coloration

Découverte d'un allèle A^{br} du gène *Agouti* responsable de la bringeure de la race bovine Normande.

Directeur de Thèse : Ahmad OULMOUDEN

Jury :

Rapporteurs :	M ^{me} Michèle TIXIER-BOICHARD	Directeur de Recherche, INRA
	M ^r Daniel VAIMAN	Directeur de Recherche, INRA
Examineurs :	M ^r Carlo RENIERI	Professeur, Université de Camerino
	M ^r Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherche, INRA
	M ^r Raymond JULIEN	Professeur, Université de Limoges
	M ^r Ahmad OULMOUDEN	Maître de Conférences, Université de Limoges

Génétique moléculaire de la coloration : Découverte d'un nouvel allèle A^{br} du gène *Agouti* responsable de la bringeure de la race bovine Normande.

L'objectif de ce projet de recherche est l'identification de marqueurs moléculaires associés aux gènes de coloration qui pourraient être utilisés pour la traçabilité des produits d'origine bovine. Parmi les gènes de coloration, *Agouti* code une protéine antagoniste de la fixation de l'hormone α -MSH sur le récepteur aux mélanocortines 1 (Mc1r), codé par le gène *Extension*, et permet le « switch » de la synthèse d'eumélanine (noir/marron) vers la synthèse de pheomélanine (jaune/rouge), dans les mélanocytes de la peau. Nous démontrons dans ce travail que trois promoteurs alternatifs dirigent l'expression de transcrits, porteurs de régions 5'UTRs différentes, dans de nombreux tissus, ce qui suggère un rôle probable d'Agouti dans différentes fonctions physiologiques, en plus de la coloration chez le bovin. La race Normande, de génotype E^+/E^+ au locus *Extension*, a un phénotype bringé. La bringeure est une présence variable de poils noirs sur un fond coloré rouge/brun. Le gène *Agouti* est surexprimé chez la Normande. Un élément de type LINE, inséré dans la région 5' génomique, provoque la surexpression de transcrits alternatifs. Le niveau de méthylation de l'élément LINE est responsable de la répression aléatoire du gène *Agouti* dans la peau Normande. Ce nouvel allèle *Agouti* (A^{br}) est présent à l'état homozygote dans la race Normande. Enfin, l'immunodétection au niveau de la peau bovine a révélé une forme libre tétramérique de la protéine Agouti et une forme liée à une protéine de grande taille.

Mots-clés : Agouti, pigmentation, races bovines, LINE, méthylation.

Molecular colour genetics: Discovery of a new allele A^{br} of the *Agouti* gene responsible of the brindle pattern of the Normande bovine breed.

The aim of this research project is the identification of molecular markers in coat-colour genes which could be used for bovine products traceability. Within coat colour genes, *Agouti* encodes an antagonist protein for the α -MSH hormone binding to the melanocortin 1 receptor (Mc1r), coding by the *Extension* gene, and allows the switch from the eumelanin (black/brown) synthesis to the pheomelanin (yellow/red) synthesis, in skin melanocytes. Here we show that three alternative promoters directs the widespread expression of transcripts, differing in their 5'UTR regions, which suggests a putative role of Agouti in others physiological functions, besides pigmentation in bovine. The Normande breed, wild type E^+/E^+ at the *Extension* locus, displays a brindle pattern. This pattern is defined by a variable presence of black hairs over a red/brown background. The *Agouti* gene is over-expressed in Normande breed. A LINE element, inserted in the 5' genomic sequence, promotes the over-expression of *Agouti* alternative transcripts. The methylation status of the LINE element is responsible for the variegated expression accounting for the brindle coat colour pattern. Finally, immunodetection in bovine skin reveals a tetramer of Agouti and an Agouti protein linked to a high sized protein.

Key words: Agouti, pigmentation, cattle, LINE, methylation.

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): 337-345.

Girardot, M., Martin, J., Guibert, S., Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A. (2005). Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res.* 18(1): 34-41.

Girardot M*, Guibert S*, Gallard Y, Larroque H and Oulmouden A. Brindle cattle coat color: epigenetic regulation of a new *Agouti* allele. *: equal contribution. (Soumis pour publication dans *Genetics*).

Communications orales

Girardot M. (2004) Le gène *Agouti* et la pigmentation. Rencontre "Gènes de Coloration des Animaux Domestiques" (GCAD), 12-13 Feb, Paris, FRANCE.

Girardot M. (2003) Coloration bovine: Le gène *Agouti*. 4^{ème} "Séminaire des Thésards INRA", 14-15 Mai, Rennes, FRANCE.

Girardot M. (2002) Gènes et enzymes de la mélanogenèse. Rencontre "Gènes de Coloration des Animaux Domestiques" (GCAD), 16-17 Dec, Limoges, FRANCE.

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.

Liste des abréviations

α -MSH: α -Melanocyte Stimulating Hormone

aa : acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique

complémentaire

Agrp : Agouti Related Protein

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASP/ASIP : Agouti Signaling Protein

Atrn : Attractine

BSA : Albumine Sérique Bovine

Bt : Belted

CRE : cAMP Responsive Element

CREB : CRE Binding protein

DCT : Dopachrome Tautomérase

ddNTP : Didésoxynucléotide Triphosphate

DEPC : diethylpyrocarbonate

Dnase : Déoxyribonucléase

dNTP : Désoxynucléotide Triphosphate

DHI : Dihydroxyindole

DHICA : Dihydroxyindole Carboxylic acid

DOPA : Dihydroxyphenylalanine

Edn3 : Endothéline 3

Ednrb : récepteur de l'Endothéline 3

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EGF : Epidermal Growth Factor

FAS : Fatty Acid Synthase

GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate

Dehydrogenase

Gp100/Pmel17/Silv : Protéine Silver

GSP1,2 : Gene Specific Primer 1 et 2

GTP : Guanine Triphosphate

GTPase : Guanosine 5'-Triphosphatase

HAT : Histone Acetyl Transferase

HDAC : Histone Deacetylase

IAP : Intra-cisternal A Particle

IRES : Internal Ribosome Entry Site

ITAF : IRES Trans Acting Factors

Kb : Kilobase

Kit/ c-kit : récepteur de la famille des tyrosine

kinases

Kitl : Kit Ligand

LINE : Long Interspersed Nuclear Element

ls : lethal-spotting

LTR : Long Terminal Repeat

MBD : Methyl-CpG-Binding Domain

MC1R : Récepteur 1 aux Mélanocortines

md : mahoganoïd

MeCP2 : Methyl-CpG-binding Protein 2

mg : Mahogany

MGF : Mast Growth Factor

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MOPS : 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid

nt : nucléotides

NUP : Nested Universal Primer

ORF : Open Reading Frame

PAX3 : Paired box gene 3

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PKC : Protéine kinase C

PNGase : Peptide N-Glucosidase

PPAR- γ : Peroxisome Proliferator activated
receptor

RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA Ends-
PCR

RE, RER : Réticulum Endoplasmique, Réticulum
Endoplasmique Rugueux

RT-PCR : Reverse transcription-PCR

SCF : Stem Cell Factor

SDS, SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate,
Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel
Electrophoresis

SINE : Short Interspersed Nuclear Element

SI : Piedbald-lethal

SL : Steel factor

SOX10 : SRY-box containing gene 10

STAT : Signal Transducers and Activators of
Transcription

TEMED : TétraméthylèneDiamine

TGN : réseau trans-Golgi

TSR : Template Sequencing Reagent

Tyr : tyrosinase

Tyrp1 : tyrosinase related protein 1

UMR : Unité Mixte de Recherche

uORF : upstream ORF

UPM : Universal Primer Mix

UPRA : Unités Nationales de Sélection et de
Promotion de Race

UTR : Région non traduite

W : Dominant white-spotting

x

Table des matières

Introduction	1
Données bibliographiques	3
La pigmentation des mammifères	3
Le développement des mélanocytes	5
Les composants du mélanosome	9
Le transport des mélanosomes	12
La régulation de la mélanogenèse	12
Les loci impliqués dans la coloration des races bovines	15
Le locus <i>Extension</i>	15
Le locus <i>Agouti</i>	17
Le locus <i>Bringé (Brindle)</i>	18
Le locus <i>Albino</i>	18
Le locus <i>Dun</i>	19
Le locus <i>Dilute</i>	19
Les mutations white-spotting	19
Le gène <i>Agouti</i>	23
Structure du gène	23
Les effets pléiotropes associés à la sur-expression d' <i>Agouti</i>	26
Structure de la protéine <i>Agouti</i>	29
Partenaires d' <i>Agouti</i>	30
Objectif et stratégie de recherche	33
Matériels et Méthodes	35
Matériel biologique	36
Méthodes	37
Préparations et traitements des ARN totaux	37
Analyses des acides nucléiques	38
Analyses des protéines	40

Résultats	43
Le gène <i>Agouti</i> bovin est exprimé grâce à trois promoteurs alternatifs	44
Introduction	44
Résultats et discussion	55
La bringeure est produite par un nouvel allèle <i>Agouti</i> (<i>A^{br}</i>)	65
Introduction	65
Résultats et discussion	97
Détection de la protéine Agouti dans la peau.	103
Résultats et discussion	105
Conclusions et perspectives	107
Références	113
Annexes	125
Index	139

Figures et Tables

Figure 1 : Migration des mélanoblastes issus des crêtes neurales lors de l'embryogenèse.	4
Figure 2 : Voie de transduction des signaux de migration, développement et de différenciation des mélanocytes.	6
Figure 3 : Biogenèse des mélanosomes dans les mélanocytes et transport vers les kératinocytes environnant.	10
Figure 4 : Biosynthèse des mélanines.	10
Table 1 : Loci génétiques décrits chez le bovin.	14
Figure 5 : Quelques exemples de races bovines, leurs loci de pigmentation et les interactions génétiques de leurs différents allèles.	16
Figure 6 : Le gène <i>Agouti</i> murin et certaines de ses mutations.	22
Figure 7 : Structure de la protéine <i>Agouti</i> .	28
Figure 8 : Interactions des protéines <i>Attractine</i> , <i>Agouti</i> et <i>Mc1r</i> .	31
Figure 9: Alignement des séquences codantes bovine, murine et humaine du gène <i>Agouti</i> et de leurs protéines.	54
Figure 10: Analyse par Southern blot du gène <i>Agouti</i> bovin.	56
Figure 12: Structure secondaire putative de la région 5'UTR du transcrit B (714 pb).	58
Figure 11: Structure secondaire putative de la région 5'UTR du transcrit A (414 pb).	58
Figure 13: Hypothèses sur les modifications des structures secondaires en amont du codon d'initiation de l'ORF d' <i>Agouti</i> dans les transcrits de type A et B.	60
Figure 14: La bringeure chez deux animaux de race Normande.	64
Figure 15: Modes de co-régulation probables par différents co-acteurs connus de l'action d' <i>Agouti</i> sur la pigmentation.	98
Figure 16: Hypothèse sur le de-silencing du LINE de l'allèle <i>A^{br}</i> .	100
Figure 17: Détection de la protéine <i>Agouti</i> bovine par Western blots.	104

Introduction

Bien avant les travaux de Gregor Mendel (1822-1884), les êtres humains ont mis à profit l'hérédité des caractères les plus intéressants pour eux. Cependant, cette sélection « artificielle » qui consistait à domestiquer et à faire reproduire les espèces d'intérêts était empirique. L'avènement de la génétique, et les premiers travaux de Mendel, ont permis de comprendre les mécanismes génétiques sous-jacents à l'hérédité. Depuis lors, la sélection des caractères d'intérêts s'appuie sur la génétique. L'amélioration d'animaux domestiques dédiés à l'alimentation humaine a conduit à une sélection toujours plus rigoureuse et à l'isolement génétique de différentes populations parmi la même espèce, autrement appelées races.

Les éleveurs associaient empiriquement la qualité des produits dérivés d'origine bovine aux caractères phénotypiques de chaque race bovine. En effet, les races Charolaise, Limousine, Salers, pour ne citer que quelques exemples, sont considérées comme des races à viande, alors que la Monbéliarde ou la Prim'Holstein sont des races laitières. Par conséquent, la recherche des meilleurs rendements de la part des troupeaux bovins s'est accompagnée de la standardisation des races avec la création des herd-books qui regroupent toutes les caractéristiques phénotypiques. Parmi ces dernières, les patrons de coloration de la robe bovine figurent dans les herd-books. Actuellement, les sélectionneurs sont à la recherche de tests plus efficaces et plus rapides que l'étude de la généalogie et de la descendance des taureaux reproducteurs pour sélectionner les animaux les plus intéressants pour la reproduction d'une race. C'est pourquoi, depuis quelques années, la recherche de tests génétiques permettant la caractérisation des races bovines est très active. Dans ce contexte, une première approche consiste en la recherche de marqueurs moléculaires en relation avec la pigmentation des races bovines. Une deuxième approche serait la recherche de tous les marqueurs moléculaires polymorphiques associés à une race, c'est-à-dire des marqueurs couvrant tout le génome (BOVMAP). Une dernière approche, actuellement en cours chez la Hereford (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/index.html>), est le séquençage du génome de différentes races. Ces deux dernières approches sont certainement les plus rigoureuses et ambitieuses, cependant elles se heurtent au problème de la variabilité génétique individuelle au sein d'une même race et au fait que les marqueurs ou les gènes ne sont pas encore tous associés aux

caractères phénotypiques d'intérêts de chaque race. Au laboratoire, la première méthode est mise en œuvre. Les travaux de recherche consistent à établir les allèles ou formules alléliques responsables des différents patrons de coloration. Un ou des marqueurs pour chaque race pourraient être d'une grande aide dans les schémas de sélection mis en œuvre actuellement. Mais bien évidemment, leur utilité est limitée car ces marqueurs ne sont pas forcément liés aux autres caractéristiques d'une race.

La démarche que j'ai utilisée au cours de ce travail est basée d'une part sur les données moléculaires acquises chez la souris qui est un animal modèle en génétique et d'autre part sur les données génétiques relatives aux patrons de coloration chez le bovin. Ces données seront donc présentées lors de l'exposé bibliographique. De plus, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents à la coloration, que l'on pourrait qualifier d'ascendante (Bottom-Up : du phénotype au génotype). En effet, la génétique de la pigmentation permet non seulement de comprendre la coloration de la peau, des poils ou cheveux (phanères), et des yeux, mais aussi toutes les maladies associées aux défauts de la pigmentation. Par exemple, le gène *Agouti* qui constitue le cœur de mon sujet d'étude dans ce travail de thèse, intervient non seulement dans la coloration, mais il est aussi impliqué dans les phénomènes d'obésité observés chez la souris. Par conséquent, les données acquises chez le bovin que je vais présenter ici sont aussi une source de données pour la pigmentation humaine et les effets secondaires associés à une dérégulation du gène *Agouti*.

Mon travail de thèse a donné lieu à deux articles, dont l'un est publié et le deuxième soumis pour publication. J'ai également contribué aux travaux publiés dans un troisième article. Les résultats présentés dans le premier article concernent la régulation du gène *Agouti* bovin. Le deuxième article démontre l'implication du gène *Agouti* dans la définition du patron de coloration bringé de la race Normande. Des données complémentaires à ces deux articles en particulier seront présentées. Enfin, les résultats seront discutés et mis en perspective dans la dernière partie de ce mémoire.

Données bibliographiques

La pigmentation des mammifères

L'analyse génétique de la coloration du pelage chez la souris est étudiée depuis longtemps. Cet animal modèle demeure depuis un siècle un sujet d'étude pour les généticiens et les embryologistes et a permis un grand nombre de découvertes majeures. Au début du XX^{ème} siècle, des variétés de souris ont permis de tester les théories Mendéliennes de liaisons et d'assortiments indépendants des caractères de la pigmentation. A la fin de ce même siècle, elles ont été utilisées pour établir la première carte de liaison du génome de la souris et ont été indispensables pour les généticiens du développement, étudiant les sites d'action des gènes. Par ailleurs, l'élucidation des bases génétiques affectant la coloration de ces mutants a permis de comprendre certaines maladies génétiques humaine ayant les mêmes altérations moléculaires (BARSH 1996; JACKSON 1997).

Aujourd'hui, l'étude intensive des mutants naturels et, plus récemment, des mutants issus des programmes de mutagenèse aléatoire ont permis de recenser un nombre impressionnant de loci impliqués dans la pigmentation des mammifères. On dénombre actuellement 127 loci et plus de 800 allèles (BENNETT et LAMOREUX 2003). Toutes ces mutations sont autant d'acteurs moléculaires qui sont répartis dans différents groupes fonctionnels : le développement et la différenciation des mélanocytes, les constituants, la biogenèse et le transport des mélanosomes et le contrôle du « switch » de la pigmentation.

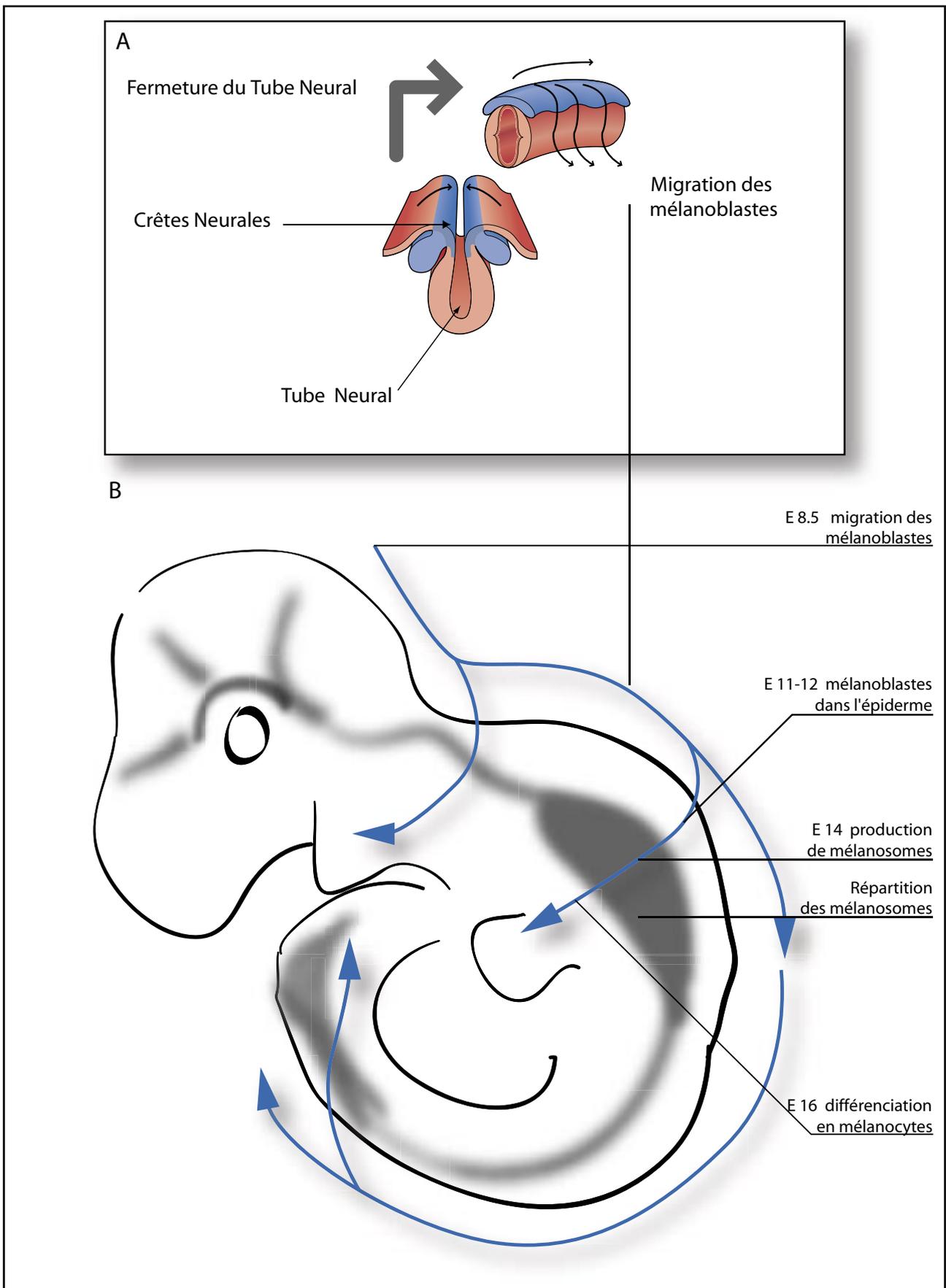


Figure 1 : Migration des mélanoblastes issus des crêtes neurales lors de l'embryogenèse. Les cellules précurseurs des mélanocytes débutent leur migration à partir des crêtes neurales (A) autour du 8.5ème jour du développement embryonnaire et finissent par se différencier autour du 16ème jour (B). La répartition non uniforme des précurseurs des mélanocytes est représentée dans cet embryon murin en développement.

Le développement des mélanocytes

Les mélanocytes, les cellules productrices des mélanines (pigments) dans la peau et les poils, et les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE) dérivent de la crête neurale au cours du développement embryonnaire des mammifères (Figure 1A). Chez la souris, autour de E8.5 (8.5^{ème} jour du développement embryonnaire), les mélanoblastes migrent selon l'axe dorso-latéral entre le dermatome et l'ectoderme. A partir de E10.5, ils migrent ventralement à travers le derme en développement. Puis à E14.5, ils commencent à envahir l'épiderme puis migrent vers les follicules pileux en développement où ils continuent à proliférer et se différencier (JORDAN et JACKSON 2000; MAYER 1973). Un travail récent a montré, grâce à l'utilisation d'embryons de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur *LacZ* sous le contrôle du promoteur de *Dct* (un gène spécifique de la lignée mélanocytaire), que le tronc de l'animal est envahi par beaucoup moins de précurseurs mélanoblastiques que les régions de la tête et de la queue (Figure 1B), et que les parties droite et gauche de l'embryon sont colonisées de manière indépendante (WILKIE *et al.* 2002). De plus, en suivant les descendants d'un seul précurseur mélanoblastique, ils ont montré que les régions colonisées étaient diffuses et chevauchantes entre elles. Les mutants dit « white-spotting » (ou piebald) qui portent des régions pigmentées plus ou moins larges et irrégulières sont affectés dans des gènes essentiels au développement des mélanocytes (*Mitf*, *Ednrb*, *Kit*, *Kitl*, *Edn3*, *Pax3*, *Sox10*). L'hypothèse actuelle suggère que ces mutations réduisent le nombre total de mélanocytes mais n'affectent pas sélectivement les cellules souches responsables de la colonisation d'une zone spécifique (PAVAN et TILGHMAN 1994). En effet, puisque la distribution des mélanoblastes n'est pas uniforme le long de l'axe rostro-caudal (tête-queue) et que les descendants mélanocytaires se retrouvent dans une zone diffuse, les régions pigmentées chez l'animal mûre coïncident avec les zones qui contenaient le plus grand nombre de mélanoblastes (la tête et la queue). Les régions blanches du white-spotting correspondent aux régions où la densité des mélanoblastes était plus faible (le tronc) (Figure 1B).

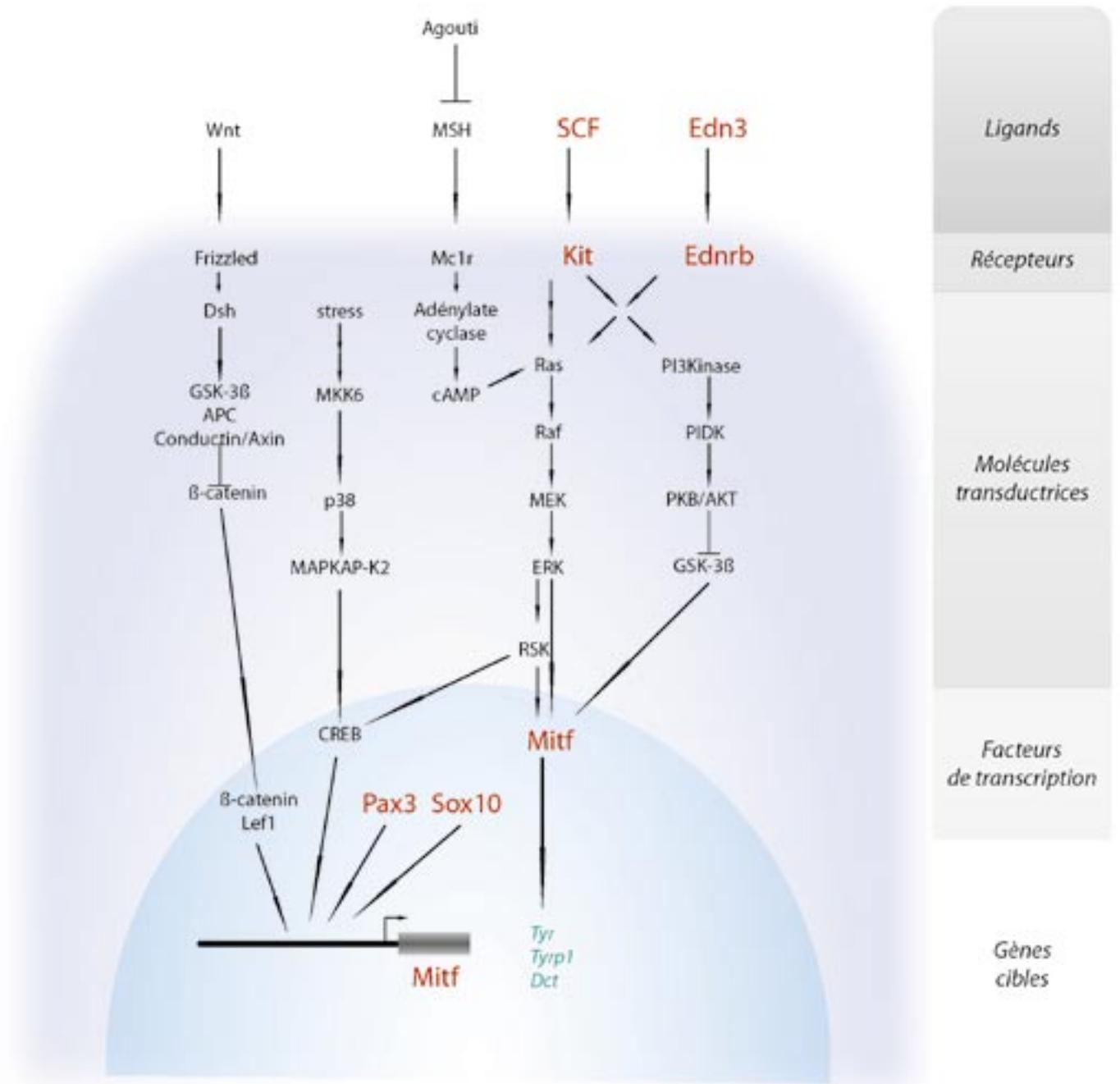


Figure 2 : Voie de transduction des signaux de migration, développement et de différenciation des mélanocytes. Les facteurs altérés chez les mutants white-spotting sont représentés en rouge. D'après Goding CR. (GODING 2000).

Parmi les gènes mutés provoquant le phénotype pie (piebald), *Mitf* est l'un des gènes majeurs. En effet, *Mitf* (Microphthalmia-associated Transcription Factor) est un facteur de transcription clé pour l'initiation de la transcription de plusieurs gènes spécifiques de la lignée mélanocytaire. Il régule l'expression des enzymes de la mélanogenèse (*Tyr*, *Tyrp1*, *Dct* (YASUMOTO *et al.* 1997))(Figure 2), des protéines de structure du mélanosome (*Silv/Pmel17/Gp100* (DU *et al.* 2003)) et d'acteurs impliqués dans la survie des mélanoblastes (*Bcl2* (MCGILL *et al.* 2002)).

Deux facteurs de transcription régulent l'expression de *Mitf* ont été identifiés chez certaines souris pie. *Pax3* (mutant *Spotch*) est un facteur de transcription à homeo-domaine régulant l'expression de *Mitf* dont la mutation à pour phénotype un ventre blanc chez la souris (EPSTEIN *et al.* 1993). *Sox10* (mutant *Dom* : *Dominant megacolon*) est un facteur de transcription de la famille HMG (High Mobility Group) homologue au facteur SRY (testis determining factor) qui active l'expression de *Mitf* dans les mélanoblastes pour promouvoir la survie et la différenciation des mélanocytes (POTTERF *et al.* 2000).

Les mutants *Dominant white-spotting* (*W*) et *Steel* (*Sl*) sont mutés dans le gène *Kit* (ou *c-Kit*) codant le récepteur de la famille de tyrosines kinases *Kit* et le gène *Kitl* (ou *SL* pour steel factor, *SCF* pour Stem Cell Factor, *MGF* pour Mast Growth factor) codant le ligand du récepteur *Kit*. *Kitl* produit une forme protéique soluble responsable de la dispersion des précurseurs des mélanocytes lors de la migration latérale et/ou de leur survie au cours de la migration, et une forme membranaire nécessaire à la survie des mélanocytes dans le derme (ANDERSON *et al.* 1990; WEHRLE-HALLER et WESTON 1995). L'activation de *Kit* par son ligand provoque la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine kinase du récepteur. Cela conduit à l'activation de la voie des MAP Kinases (MEK/ERK/RSK), PI3 Kinases, JAK/STAT et des membres de la famille Src (LINNEKIN 1999) (Figure 2). Grâce à ces molécules transductrices, *Kit* délivre non seulement un signal anti-apoptotique pour la survie des mélanoblastes, mais permet aussi l'activation transitoire de *Mitf* par phosphorylation, associée à l'augmentation du recrutement du coactivateur p300/CBP (cAMP Binding Protein, CREB) pour stimuler l'activité transcriptionnelle de son gène. Par la suite, l'ubiquitinylation de *Mitf* entraînera sa dégradation par le protéasome (GODING 2000). Le signal envoyé par *Kit* permet donc la survie et la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes.

Tout comme les mutants du couple ligand/récepteur *Kitl/Kit*, les mutations *Piedbal-lethal* (*sl*) et *Lethal-spotting* (*ls*) sont responsables d'un développement mélanocytaire anormal. La mutation *sl* touche le récepteur Endothelin 3 (*Ednrb*), un récepteur couplé à une protéine G, et

la mutation *ls* touche le gène de l'Endothéline 3 (*Edn3*), le ligand peptidique de 21 acides aminés se fixant sur *Ednrb*. L'activation de *Ednrb* par *Edn3* conduit à l'activation des signaux transducteurs des voies de signalisation incluant la PKC (Protéine Kinase C), la CamKII, et la voie des MAP Kinases (IMOKAWA *et al.* 2000) (Figure 2). De plus, il a été démontré une synergie entre le couple *Kitl/Kit* et *Edn3/Ednrb* par le biais de la voie des MAPK pour la migration des mélanoblastes (IMOKAWA *et al.* 2000). En plus de ces effets sur la migration entre E10.5 et E12.5 (SHIN *et al.* 1999), *Ednrb* est aussi nécessaire au développement des mélanoblastes dans l'épiderme après E12.5 (YOSHIDA *et al.* 1996).

La mutation *Belted (Bt)* a été identifiée récemment et correspond aux altérations du gène *Adams20* codant une métalloprotéase de type disintégrin sécrétée par les mélanoblastes pour le remaniement de la matrice extra-cellulaire et donc de leur migration (RAO *et al.* 2003; TANG 2001).

Tous ces mutants ainsi que les 14 autres de ce type décrits (BENNETT et LAMOREUX 2003), sont responsables d'une altération des processus soit de différenciation soit de migration des mélanoblastes provoquant l'apparition de pelages partiellement ou totalement dépigmentés selon la sévérité de la mutation ou le gène affecté. Ces facteurs, ainsi que tous ceux qui seront probablement découverts à la suite de mutagenèses, sont autant d'acteurs qui sont progressivement mis en place pour pouvoir comprendre le développement normal de la lignée mélanocytaire.

Les composants du mélanosome

Le mélanosome est l'organite du mélanocyte dans lequel a lieu la biosynthèse des pigments : la mélanogénèse (ORLOW 1995). Les mélanosomes sont des compartiments du mélanocyte proche des lysosomes où règne un pH acide (BHATNAGAR *et al.* 1993).

Les trois enzymes responsables de la biosynthèse des mélanines, au sein du mélanosome, sont la Tyrosinase, dont la mutation chez la souris *Albino* empêche toute synthèse de pigments (JACKSON et BENNETT 1990) ; Tyrp1 (Tyrosinase related protein 1), dont la mutation provoque l'absence de pigments noirs chez les souris *brown* (JACKSON *et al.* 1990) ; et Dct/TRP2 (Dopachrome tautomérase/Tyrosinase related protein 2) qui est mutée chez les souris *slaty* avec un pelage dilué (JACKSON *et al.* 1992).

La biogénèse des mélanosomes se déroule en quatre étapes séquentielles (Figure 3). Au stade I, ils sont ronds et localisés à la périphérie du noyau. Au stade II, le mélanosome développe des structures fibrillaires qui provoquent un allongement de sa structure. La production de ces fibres de la matrice interne et la maturation du stade I à II dépend de la présence d'une protéine de structure appelée Pmel17 (ou gp100/Silver). Juste après son transport au mélanosome de stade I, Pmel17 est clivée en plusieurs fragments qui forment la matrice fibrillaire de l'organite (YASUMOTO *et al.* 2004). Dans les cellules pigmentées, les mélanines produites par les enzymes Tyr, Tyrp1 et Dct sont déposées sur ces fibres, ce qui constitue un mélanosome de type III. Dans les tissus très pigmentés, la synthèse et le dépôt de mélanines continuent jusqu'à ce que la structure interne ne soit plus visible, on parle alors de mélanosome de stade IV. Contrairement à Tyr, Tyrp1, Dct et Pmel17, la protéine Mart-1, aussi connue sous le nom Melan-A, n'a pas de sites consensus de N-glycosylation ni de peptide signal N-terminal permettant son adressage cellulaire. Le rôle de cette protéine, localisée dans les mélanosomes de stades I et/ou II, qui n'a pas de fonction enzymatique, a été récemment élucidé par Hoashi *et al.* (HOASHI *et al.* 2005). Cette protéine de structure du mélanosome est indispensable pour l'expression, la stabilité et la maturation de Pmel17 à l'étape critique de la formation du mélanosome de stade II.

La protéine Rab38, dont la mutation provoque le même phénotype chez les souris *chocolate* que chez les souris *brown* (mutation de *Tyrp1*), est une protéine de liaison du GTP indispensable à l'adressage de Tyrp1 (LOFTUS *et al.* 2002).

Suite au repliement et à l'assemblage des trois enzymes de la famille Tyrosinase dans le réticulum endoplasmique, grâce à la chaperonne Calnexine, ces glycoprotéines sont stockées dans le TGN (Trans Golgi Network, ou réseau trans-golgien : RTG) (Figure 3), avant d'être

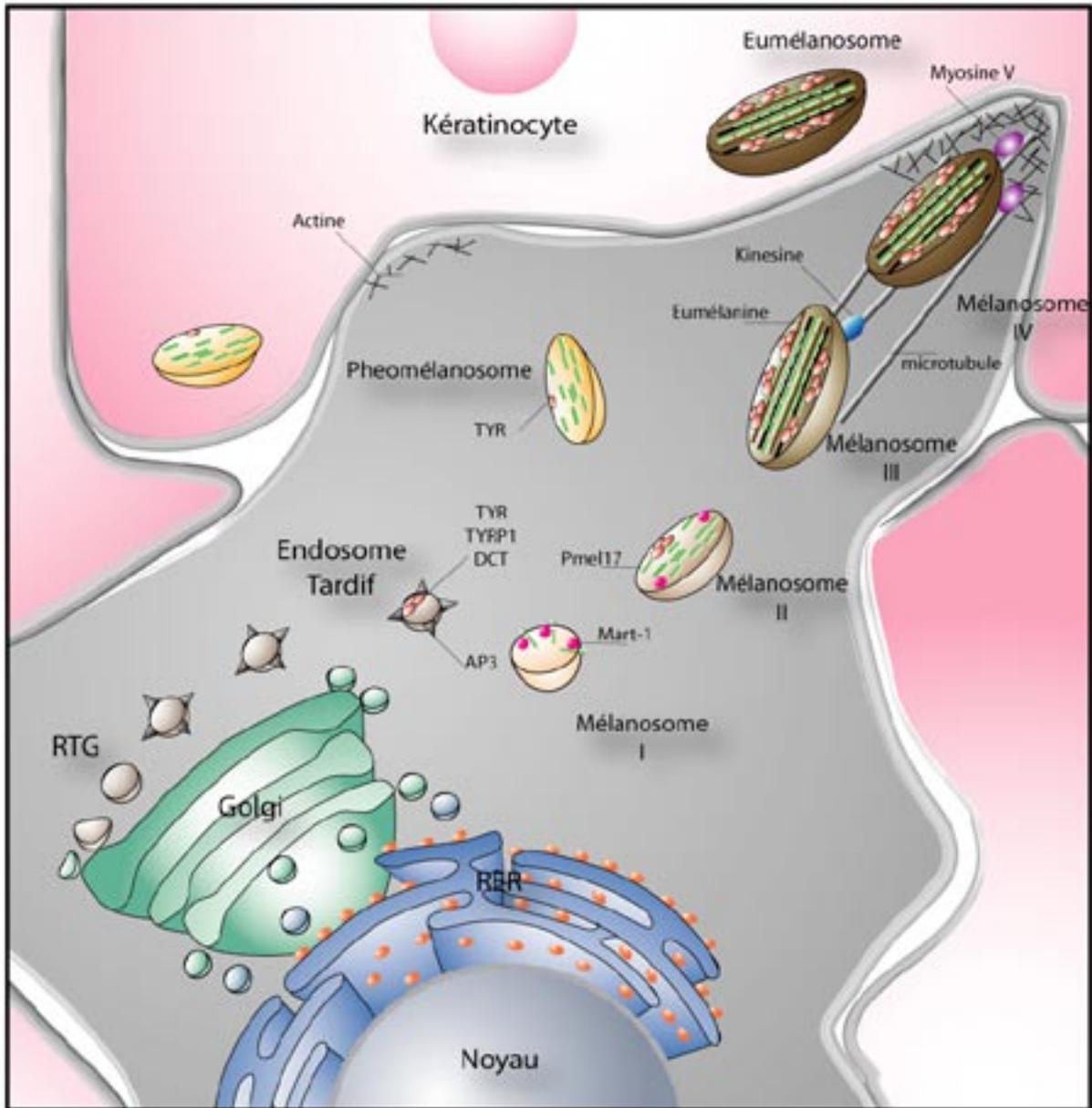
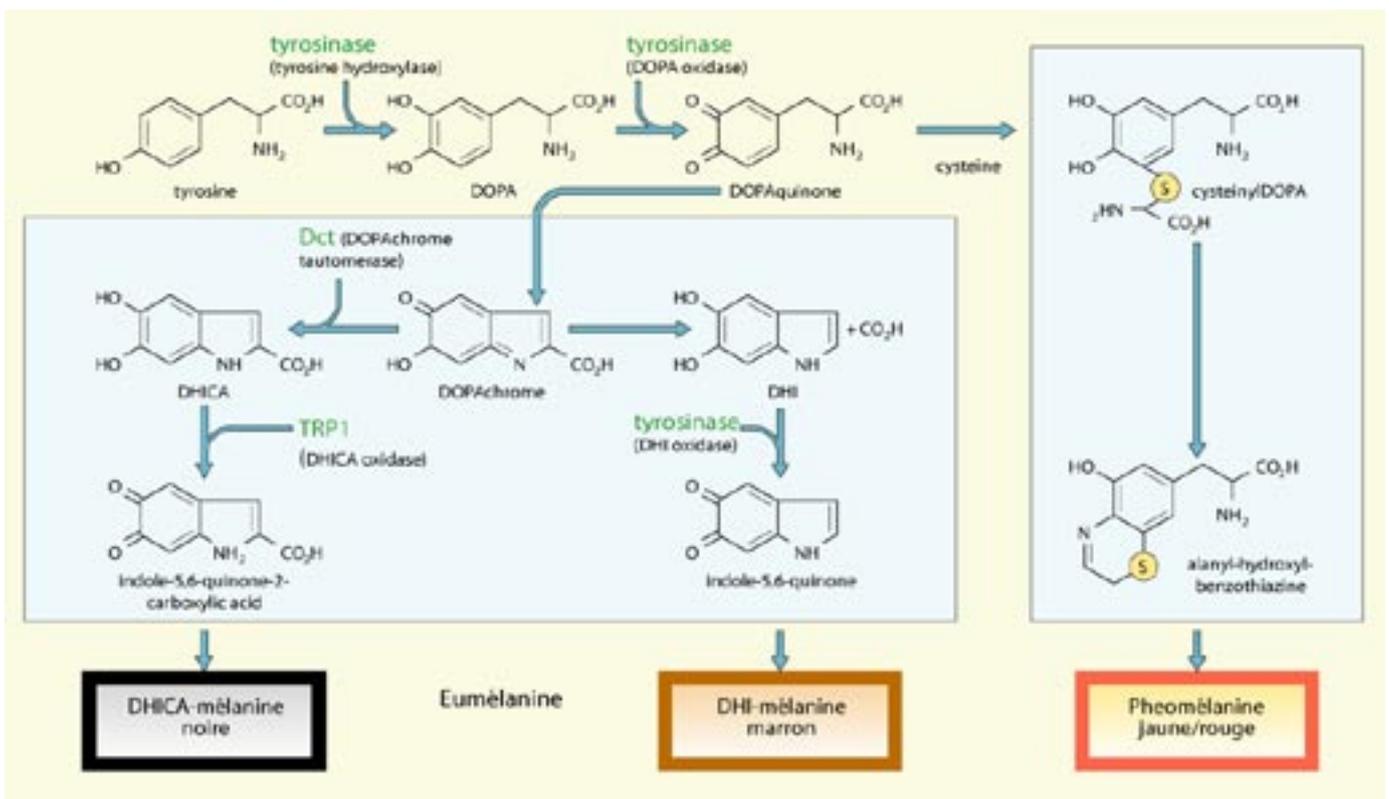


Figure 3 : Biogenèse des mélanosomes dans les mélanocytes et transport vers les kératinocytes environnant. RTG : Réseau Trans-Golgien ; RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux.

Figure 4 : Biosynthèse des mélanines. D'après Bologna et al. (BOLOGNIA et al. 2003). La tyrosinase intervient dans les deux premières étapes de la synthèse des précurseurs des mélanines, puis les enzymes Dct et Tyrp1 coopèrent avec la Tyrosinase pour la production d'eumélanines (noir/brun), ou bien le précurseur DOPAquinone est utilisé pour la production de pheomélanines en présence de cystéines. →

transportées, dans des vésicules de transport formées grâce aux protéines de manteau (dont fait partie AP3, adapter protein-3) reconnaissant les motifs di-leucines des queues cytoplasmiques de ces enzymes, vers les mélanosomes (JIMBOW *et al.* 2000).

Dans le mélanosome, l'oxydation enzymatique de l'acide aminé tyrosine est à l'origine de la synthèse des polymères que sont les pigments mélaniques. L'enzyme Tyrosinase catalyse les deux premières étapes avec l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) et l'oxydation de DOPA (intermédiaire non libre de la réaction catalytique) en DOPAquinone (Figure 4). La tyrosinase est l'enzyme clé de la mélanogénèse. Elle intervient également en aval pour l'oxydation du 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole-5,6-quinone. L'isomérisation du DOPAchrome (indolene-2-carboxylic acid-5,6-quinone) en 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) est catalysée par la DOPAchrome tautomérase (Dct) et l'oxydation du DHICA est réalisée par l'enzyme DHICA-oxydase (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. Cependant, la transformation de DOPAquinone en 5-S et 2-S-cysteinylDOPA requiert la disponibilité de dérivés soufrés comme la cystéine. Les eumélanines (noir/brun) dérivent des métabolites du DOPAchrome, alors que les pheomélanines découlent des métabolites des cysteinylDOPA (Figure 4).



Le transport des mélanosomes

Pendant que le mélanosome mature et se charge de mélanines, il est transporté vers les extrémités dendritiques des mélanocytes pour son transfert aux cellules voisines. Les dendrites sont constituées d'un cœur central de microtubules et d'un réseau périphérique d'actine subcorticale (LACOUR *et al.* 1992). Le réseau de microtubules permet le transport longue distance alors que l'actine sert au transport de proximité et au transfert des mélanosomes (KELLEHER et TITUS 1998; RODIONOV *et al.* 1998). La kinésine et la dynéine cytoplasmique sont impliquées dans le transport antérograde et rétrograde des mélanosomes sur de longues distances le long des microtubules. Les mélanosomes sont ensuite pris en charge par la Myosine V pour la mobilité dans le réseau d'actine (Figure 3). La mutation de la myosin-Va chez le mutant *dilute* provoque une dilution de la coloration en raison de l'accumulation des mélanosomes à la périphérie du noyau et donc d'une absence de leur transfert aux kératinocytes (BENNETT et LAMOREUX 2003). Le produit du gène *Rab27a* est une GTPase qui est associée à la Myosin-Va pour la capture des mélanosomes (WU *et al.* 2002), de même que la protéine Mélanophilin, produit du gène *leaden* (HUME *et al.* 2002; PROVANCE *et al.* 2002). Tout comme *dilute*, la mutation de ces deux derniers gènes provoque les phénotypes de dilution de la pigmentation des souris *leaden* (*Melanophilin*) et *ashen* (*Rab27a*) (BENNETT et LAMOREUX 2003).

Suite à leur transport vers la périphérie du mélanocyte, les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes environnants (Figure 3) soit par phagocytose des extrémités dendritiques, soit via un pore de communication intercellulaire, ou bien par exocytose des mélanines suivie d'une endocytose par les kératinocytes (YAMAMOTO et BHAWAN 1994). Actuellement, il semblerait que ce soit la troisième hypothèse qui soit admise (STINCHCOMBE et GRIFFITHS 1999) en raison de la parenté des mélanosomes avec les lysosomes.

La régulation de la mélanogenèse

Le pelage de la souris sauvage *Agouti* a la particularité de présenter une bande de pigment jaune (pheomélanine) barrant un poil noir (eumélanine). La régulation permettant la production de cette bande jaune est appelée le « switch » de la mélanogenèse dans les mélanocytes du follicule pileux. Le switch de la mélanogenèse est assuré par le récepteur aux mélanocortines 1 (Mc1r) grâce à son agoniste α -MSH et son antagoniste Agouti (ASP, Agouti Signaling Protein).

Le récepteur aux mélanocortines 1 (Mc1r) est codé par le locus *extension* (ROBBINS *et al.* 1993; SUZUKI *et al.* 1996; TAMATE et TAKEUCHI 1984) et appartient à une famille de cinq récepteurs à sept

domaines transmembranaires couplés aux protéines G (CHHAJLANI et WIKBERG 1992; GANTZ *et al.* 1993a; GANTZ *et al.* 1993b; LABBE *et al.* 1994; MOUNTJOY *et al.* 1992; ROSELLI-REHFUSS *et al.* 1993). La liaison de l' α -MSH sur Mc1r entraîne l'activation d'une adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G hétérotrimérique et l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (SUZUKI *et al.* 1996). La stimulation de la voie de l'AMPc aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding protein). Le facteur CREB stimule l'expression de *mitf* en présence du facteur SOX10 dans les mélanocytes (HUBER *et al.* 2003) (Figure 2). Le facteur MITF, spécifique de la lignée mélanocytaire, active les gènes centraux de la mélanogénèse que sont *Tyr*, *Tyrp1*, *Dct*, *Mart-1* et *Pmel17* (DU *et al.* 2003; GODING 2000), conduisant à la synthèse d'eumélanine (Figure 2). Une mutation perte de fonction telle que l'allèle *e* du gène *extension* qui code un récepteur tronqué à partir de la deuxième boucle extracellulaire, empêche la stimulation de l'expression des acteurs de la mélanogénèse et a pour conséquence un pelage jaune chez la souris (BENNETT et LAMOREUX 2003). En revanche, une mutation gain de fonction du récepteur (E^D) provoque une activation constitutive de la mélanogénèse et donc un pelage noir.

L'antagoniste compétitif de la fixation de l' α -MSH sur le récepteur Mc1r est la protéine Agouti (ou ASP) (BARSH 1999; VOISEY et VAN DAAL 2002). L'apparition de la bande subapicale jaune dans le poil de la souris sauvage correspond à l'expression transitoire d'Agouti entre le quatrième et sixième jour de la croissance du poil (LU *et al.* 1994). Des expériences d'hybridation *in-situ* avec un anticorps reconnaissant la protéine Agouti ont permis de démontrer qu'elle est exprimée dans le follicule pileux où se trouvent les mélanocytes responsables de la pigmentation du poil (MATSUNAGA *et al.* 2000). Des souris transgéniques, exprimant Agouti dans les cellules basales de l'épiderme, développent des bandes de poils jaunes correspondant aux régions de l'épiderme qui expriment la protéine. Ceci suggère une action paracrine de la protéine Agouti chez la souris (MILLAR *et al.* 1995).

Deux loci récessifs supprimeurs d'Agouti, les mutations *Mahogany* et *Mahoganoïd* (MILLER *et al.* 1997) empêchent la production de pheomélanines. Par ailleurs, *Mahogany* n'a pas d'effets sur le phénotype pheomélanique des souris *Mc1r^e/Mc1r^e*, ce qui suggère que le produit de *mg* (*Mahogany*) agit au même niveau ou en amont du récepteur aux mélanocortines (NAGLE *et al.* 1999).

Locus	Nom	Allèles	Description	Rapport de dominance	Exemples
<i>E</i>	<i>Extension</i>	<i>E^D</i>	Noir uniforme	Dominant	Prim'Holstein
		<i>E⁺</i>	Brun/Noir avec des extrémités plus sombres	–	Jersey
		<i>e</i>	Rouge	Récessif par rapport à <i>E^D</i> et <i>E⁺</i>	Limousine
<i>Br</i>	<i>Brindle</i>	<i>Br</i>	Bandes irrégulières noires sur fond brun/rouge	Dominant sur l'absence de bringeure	Normande
<i>A</i>	<i>Agouti</i>	<i>A^{bp}</i>	Modificateur du type sauvage, entièrement noir, n'est pas influencé par le sexe	Dominant en présence de <i>E⁺</i> , hypostatique par rapport à <i>E^D</i>	Prim'Holstein
		<i>a^w</i>	White-bellied : perte du rouge et distribution plus uniforme du noir	Récessif	Brown Swiss
		<i>aⁱ</i>	Fawn (fauve) perte de pigmentation rouge sur la colonne vertébrale	Récessif	Chianina
<i>Dc</i>	<i>Dilution Charolais</i>	<i>Dc</i>	Dilution du noir en gris clair, dilution du rouge en jaune clair (crème) à l'état hétérozygote	Dominant	Charolaise
<i>Ds</i>	<i>Dilution Simmentale</i>	<i>Ds</i>	Dilution modérée du noir et du rouge	Dominance incomplète	Simmentale
<i>Dn</i>	<i>Dun</i>	<i>Dn</i>	Disparition de la pigmentation rouge	Dominance incomplète	Highland
<i>S</i>	<i>Spotting</i>	<i>S^H</i>	<i>Hereford pattern</i> / face, queue, pieds blancs	Dominance incomplète	Hereford
		<i>S^P</i>	<i>Pinzgauer pattern</i> / côtés pigmentés, zones blanches sur le dos et le ventre	Dominance incomplète	Pinzgauer
		<i>s</i>	Piebald : zones irrégulières pigmentés et blanches	Récessif	Prim'Holstein
<i>R</i>	<i>Roan</i>	<i>R</i>	Combinaison de poils blancs et pigmentés	Dominance incomplète	Shorthorn
<i>Bt</i>	<i>Belting</i>	<i>Bt</i>	Belt : ceinture blanche	Dominant	Galloway
<i>Bl</i>	<i>Blaze</i>	<i>Bl</i>	Blaze : tête blanche	Dominance incomplète	Simmentale
<i>Bc</i>	<i>Brockling</i>	<i>Bc</i>	Zones pigmentés dans les parties blanches des mutants white-spotted	Dominant	Shorthorn

Table 1 : Loci génétiques décrits chez le bovin, d'après (OLSON 1999).

Les loci impliqués dans la coloration des races bovines

Depuis quelques siècles, les couleurs des robes bovines ont fasciné les Hommes comme en témoignent les peintures de bovidés laissées sur les parois de la grotte de Lascaux par nos ancêtres préhistoriques. C'est vers le XVII^{ème} siècle que les sélectionneurs ont commencé à produire des races bovines avec une robe plus ou moins uniforme, comme un outil pour l'identification des races.

Pour pouvoir étudier les variations de coloration chez les différentes races, il est nécessaire d'avoir un référentiel. Ce référentiel est souvent le phénotype sauvage en génétique. Pour les bovins, le choix d'un type sauvage pour la pigmentation est plus délicat, mais la couleur des aurochs, l'ancêtre sauvage de la plupart des races de *Bos Taurus*, semble la plus appropriée (OLSON 1999). Les aurochs étaient essentiellement de couleur rouge/brun à brun/noir. Il y avait une certaine variation de coloration noire entre les parties du corps, et, d'autre part, les mâles étaient plus sombres. Les animaux de phénotype sauvage ont tendance à avoir les extrémités plus sombres (la tête, la nuque, les pattes et le postérieur). La pigmentation évolue aussi avec l'âge : les jeunes bœufs sont rouge/brun et deviennent plus sombres en vieillissant.

La plupart des variants par rapport au type sauvage sont rouges ou noirs uniformes. Les autres types de coloration sont des modifications de proportion des trois couleurs principales : le noir, le brun/noir sauvage et le rouge. On peut observer une différence d'intensité de l'une de ces couleurs ou même une disparition totale. Ainsi, différents allèles ont été proposés pour rendre compte des variations de coloration entre les races. De plus, c'est la combinaison d'allèles (démonstrées ou supposées) à différents loci qui permet de rendre compte de ces différences phénotypiques (Table 1).

Le locus *Extension*

Ce locus est responsable de la majeure partie des variations observées chez les races bovines. Les trois allèles présents à ce locus sont :

E^D , responsable du noir dominant ;

E^+ , le sauvage permettant toutes les combinaisons de rouge ou rouge/brun et de noir ;

e , exprimant le rouge récessif.

Le rapport de dominance de ces allèles est $E^D > E^+ > e$.

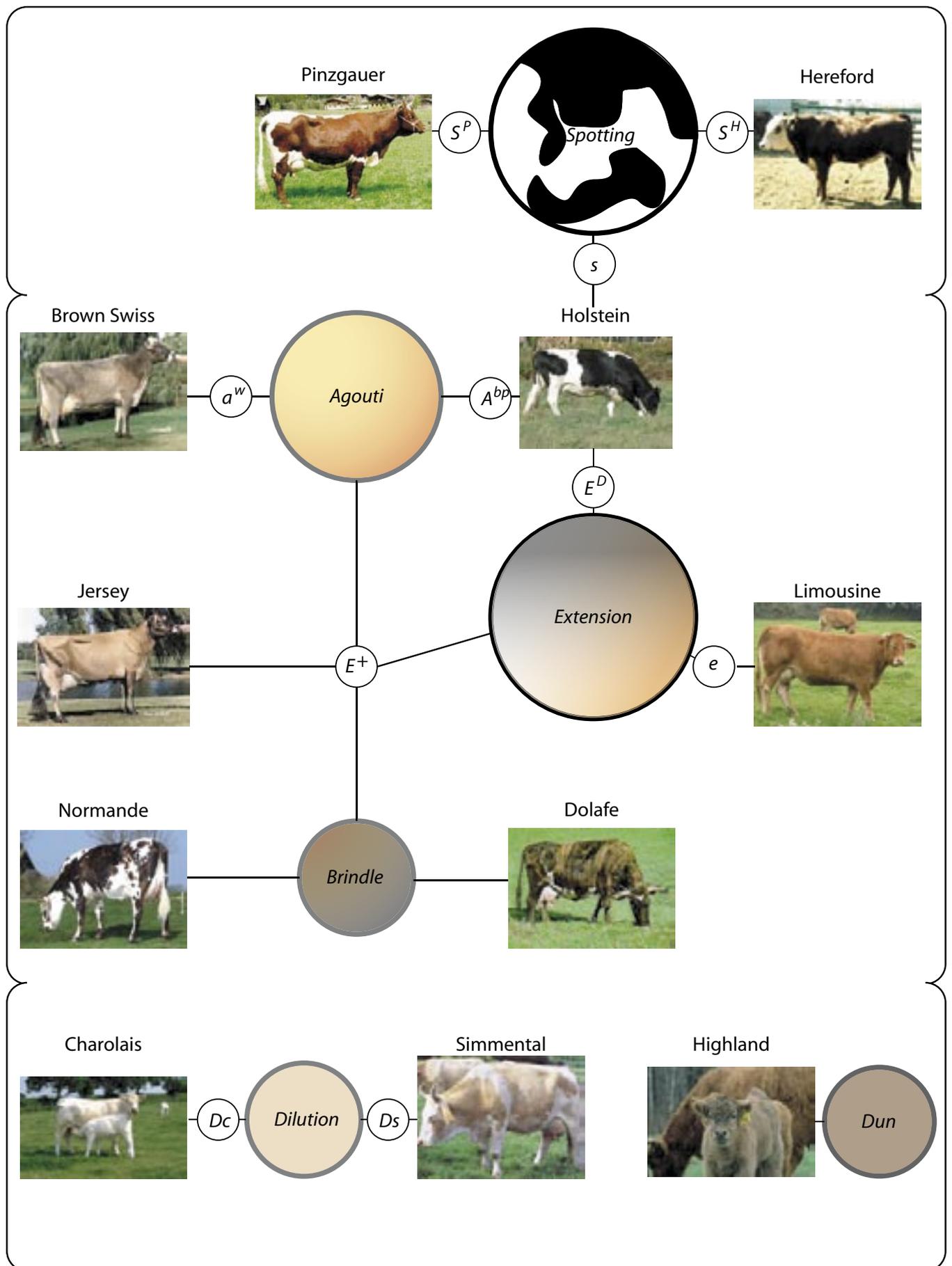


Figure 5 : Quelques exemples de races bovines, leurs loci de pigmentation et les interactions génétiques de leurs différents allèles. La partie haute de la figure illustre quelques mutations du développement embryonnaire des mélanocytes qui provoquent le phénotype white-spotting. La partie centrale regroupe les loci impliqués dans la régulation de la mélanogenèse. La partie basse regroupe les mutants de la maturation et du transport des mélanosomes.

Ce locus a été identifié comme le récepteur aux hormones mélanocortines (*MSH*: Melanocyte-Stimulating Hormone) (ROBBINS *et al.* 1993). L'allèle E^D correspond à une substitution, d'une Thymine par une Cytosine en position 296 de la partie codante du récepteur aux mélanocortines 1 (*Mc1r*), qui produit un changement d'acide aminé leucine en proline (KLUNGLAND *et al.* 1995). Cette mutation ponctuelle rend ce récepteur à sept domaines transmembranaires constitutivement actif et produit, par exemple, le phénotype noir observé chez la race Prim'Holstein (Figure 5). L'allèle e se caractérise par la délétion d'une Guanine en position 310 de la partie codante et produit une protéine tronquée, inactive par décalage du cadre de lecture (JOERG *et al.* 1996; KLUNGLAND *et al.* 1995). Cet allèle est retrouvé, entre autres, chez la race Limousine (Figure 5). Un quatrième allèle E^I (ROUZAUD *et al.* 2000) correspond à une insertion de 12 pb en position 669 de la partie codante. Il produit une duplication de quatre acides aminés dans la troisième boucle cytoplasmique du récepteur connue pour interagir avec les protéines G. Cet allèle a été identifié dans les races Aubrac et Gasconne.

Le locus *Extension* est localisé sur le chromosome 18 bovin (KLUNGLAND *et al.* 1995). Les allèles du locus E régulent la production de l'enzyme tyrosinase chez les mammifères pour produire différentes quantités de pigments noir/brun et rouge/jaune. L'allèle E^D , codant un récepteur *Mc1r* constitutivement actif, stimule la production d'eumélanine (pigment noir/brun) par l'intermédiaire de la Tyrosinase. L'allèle récessif e ne peut ni être stimulé par l' α -MSH ni augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc et donc ne peut pas stimuler la production d'eumélanine. La pheomélanine est produite par défaut dans les mélanocytes. L'allèle sauvage E^+ , quand a lui, peut être stimulé par l'agoniste α -MSH et inhibé par la protéine antagoniste Agouti pour produire différentes quantités d'eumélanine et de pheomélanine respectivement.

Le locus *Agouti*

Bien que différents auteurs aient supposés des mutations au locus *Agouti* bovin, homologues aux mutations chez les autres espèces (ADALSTEINSSON *et al.* 1995; LAUVERGNE 1966; OLSON 1982; SEARLE 1968), les allèles *Agouti* ne sont pas connus. C'est pourquoi la plupart des allèles bovins a été nommée en fonction des allèles connus chez d'autres espèces et ayant un phénotype similaire à certaines races bovines. Les mutants du locus *Agouti* ont une influence sur le patron de coloration sauvage, c'est-à-dire portant l'allèle E^+ (Figure 5). L'allèle *Agouti* A^+ sauvage,

permettant l'expression à la fois de pigments noirs et rouges a été supposé (OLSON 1999), de même que l'allèle récessif a , qui produit à l'état homozygote un pelage noir uniforme (ADALSTEINSSON *et al.* 1995). L'allèle a , à l'état homozygote, n'aurait donc pas d'influence sur la coloration en présence des allèles e/e ou $E^D/—$. Une modification du phénotype sauvage, qui produit une augmentation de la coloration noire sur presque tout le corps de l'animal, a été attribuée à l'effet de l'allèle *Agouti* A^{pb} (*patterned blackish*) (Table 1). Ce génotype, qui est insensible à l'effet du sexe sur la coloration, est probablement responsable de la coloration noire observée chez les races Jersey, Brown Swiss ou Prim'Holstein (Figure 5). Le ventre plus claire de certaines races (Limousine, Jersey) pourrait être produit par l'allèle récessive a^i (fauve) (Table 1). La race Brown Swiss est décrite comme porteuse de l'allèle a^w (White-bellied) en raison de son ventre blanc et de la perte de la pigmentation rouge (Figure 5).

Le locus *Bringé* (*Brindle*)

Tout comme le gène *Agouti*, le gène *Br* est hypostatique par rapport à E^D et e (Figure 1). Le phénotype bringé correspond à la présence de bandes noires verticales irrégulières sur tout le corps de l'animal ou parfois confinées à la tête, le cou et le postérieur. Le fond coloré entre les bandes noires peut varier du rouge clair au marron foncé. Cet allèle *Br* est présent chez la Normande, la Texas Longhorn, la race islandaise Dølafe (Figure 5) et peut produire la bringeure observée lors de croisements, particulièrement avec les races de zébu (OLSON 1999). Apparemment, le gène *Bringé* ne peut pas modifier le phénotype en présence du génotype e/e , qui empêche la formation de pigments noirs, ni en présence du génotype $E^D/—$ qui ne produit que du noir. L'expression de la bringeure n'est possible qu'en présence du génotype E^+/E^+ . Une hypothèse sur la variation de quantité de bringeure a été proposée par Olson (OLSON 1999). Les régions bringées sont celles qui auraient été marron foncées ou noires si l'allèle *Br* n'était pas présent, c'est-à-dire celles qui sont le plus influencées par l'action de α -MSH. Autrement dit, la bringeure serait une modification du patron de coloration produit par l' α -MSH et le locus E^+ .

Le locus *Albino*

Des cas d'albinismes peuvent se produire occasionnellement chez des bovins de différentes races. Dans ce cas, les animaux sont entièrement dépigmentés à la fois au niveau de la peau, le pelage et les yeux. Les mutants au locus *Albino* (c/c) correspondant à la *Tyrosinase*, ne sont jamais conservés ni utilisés en reproduction en raison de leur grande sensibilité à la lumière

(absence de pigments protecteurs dans la rétine).

Le locus *Dun*

La mutation de ce locus ressemble aux mutants *Chinchilla*, observés dans d'autres espèces. Les mutants *Dun* sont dépourvus de pigments rouges et leurs extrémités sont noires, comme chez la race Highland (Figure 5). Cet allèle hypothétique aurait donc un effet sur la coloration rouge, mais ne modifierait pas la coloration noire/brune des animaux porteurs.

Le locus *Dilute*

Deux loci avaient été proposés pour rendre compte de la dilution du pelage observée chez les races Charolaise et Simmental. La dilution correspond à une diminution de la coloration produite par les autres loci de la pigmentation. Par exemple, la Charolaise est porteuse du génotype *e/e* et devrait être rouge. Cependant, elle est aussi porteuse de la mutation *Dilute* (*Dc*), qui éclaircit le pelage et le rend blanc/crème, à l'état homozygote. La race Simmentale présente aussi une dilution de sa coloration. Ces deux phénotypes avaient tendance à être distingués (Table 1) avant que la mutation correspondante ne soit isolée au laboratoire (brevet n° :03/09/161 ; « Utilisation du gène *Silver* pour l'authentification de l'origine raciale des populations animales et de leur produits dérivés » ; INRA/Université de Limoges). La mutation correspondante chez la souris est *Silver*. Il a été démontré que le produit du gène *Silver* (*gp100/Pmel17*) est une protéine indispensable pour la maturation du mélanosome et l'organisation de la matrice protéique du mélanosome (YASUMOTO *et al.* 2004). Les mélanosomes sont bloqués au stade de prémélanosome (stade I). La matrice mélanosomale n'est pas fonctionnelle et par conséquent, la synthèse correcte des mélanines par les enzymes de la famille *Tyrosinase* (*Tyr*, *Tyrp1*, *Dct*) n'a pas lieu.

Les mutations white-spotting

Le white-spotting ou piebaldisme (JACKSON 1994) correspond à des zones blanches (dépigmentées), de tailles et de formes variables, combinée à la présence de zones pigmentées. Ce phénotype est certainement le plus caractéristique de certaines races bovines telles que la Prim'Holstein, la Monbéliarde, la Hereford, la Normande, la Maine-Anjou et bien d'autres races de phénotype pie. Cependant, ce terme générique de white-spotting recouvre plusieurs situations génotypiques qui s'expliquent grâce à plusieurs allèles au locus *Spotting*. Au moins

trois mutations du locus *Spotting* sont supposées en plus de l'allèle sauvage S^+ (Table1) :

L'allèle S^H responsable du patron de coloration de la Hereford entièrement colorée sauf au niveau de la face, la queue et les pattes.

S^P pour le patron de la race Pinzgauer qui est coloré sur les flancs mais pas au niveau de la colonne vertébrale ni sur le ventre.

Et enfin, l'allèle récessif s , présent par exemple chez la Prim'Holstein, est responsable d'un phénotype pie très irrégulier et en proportion variable (Figure 5).

Une étude sur les proportions de blanc et de noir chez la race Prim'Holstein à été menée (BECERRIL *et al.* 1994) et a démontré une variabilité de proportion de blanc allant de 5-10 % à 90-95 %. Les auteurs ont proposé des facteurs modificateurs, quantitatifs et hautement héritable (~90%), pour expliquer le degré de white-spotting chez cette race. Cette hypothèse pourrait s'appliquer à tous les autres cas de white-spotting chez les autres races (OLSON 1999). Plus récemment, le gène impliqué dans le phénotype pie de la Prim'Holstein a été localisé sur le chromosome 6 bovin. Le gène candidat est *Kit* (GROSZ et MACNEIL 1999), le récepteur impliqué dans le développement des mélanocytes en présence de son ligand Steel.

Un autre type de white-spotting a été supposé pour expliquer les taches blanches que l'on observe sur la face d'animaux Simmental et Prim'Holstein. Ce locus a été dénommé *Blaze* (OLSON 1999) (Table 1), mais il semblerait qu'il s'agisse encore d'une mutation du gène *Kit* (GROSZ et MACNEIL 1999).

Le patron de coloration Roan, caractéristique des races Shorthorn et Blanc bleu belge, correspond à un mélange de poils blancs et colorés, sur au moins une partie du corps de l'animal hétérozygote pour ce locus (Table 1). Les homozygotes pour ce locus sont blancs (R/R) ou colorés (r^+/r^+) mais ne présentent pas le mélange de poils des deux types. Une proportion des femelles homozygotes blanches présente les symptômes de la maladie White Heifer Disease (responsable de diverses malformations génitales). La mutation responsable de ce phénotype se trouve dans le gène *MGF* (Mast Cell Growth Factor) (SEITZ *et al.* 1999), aussi appelé *Kit ligand*, et a été localisée sur le chromosome 5 bovin (CHARLIER *et al.* 1996). La mutation en position 654 change l'alanine 193 en acide aspartique. Une interprétation possible du phénotype a été rapportée par Charlier *et al.* (CHARLIER *et al.* 1996). Le ligand Steel du récepteur tyrosine kinase c-kit impliqué dans la migration et/ou la prolifération des mélanoblastes serait complètement déficient chez les individus R homozygotes et donc ne permettrait pas la

migration de ces cellules dans le follicule pileux. Les animaux hétérozygotes quant à eux, ont une proportion de follicules pileux qui ne sont pas colonisés par des mélanoblastes. Ceci implique que le nombre de mélanoblastes qui colonisent un follicule pileux doit être faible chez le bovin en général, ou bien chez les individus r^+R , plus spécifiquement. La colonisation d'un follicule par un seul mélanoblaste serait alors suffisant pour générer le nombre de mélanocytes nécessaire à la formation d'un poil entièrement pigmenté, et expliquerait pourquoi les hétérozygotes ont un mélange de poils complètement pigmentés ou bien totalement blancs.

Certaines races bovines ne sont colorées que sur les flancs. L'allèle proposé est C_s (Colour-sided). Le phénotype pie produit par ce locus est différent de S^p , puisqu'à l'état hétérozygote, les individus ont un spotting avec des bordures irrégulières, un peu comme le type roan, alors que les individus S^p ont des bordures bien délimitées (OLSON 1999) (Table 1).

Le type de coloration Belted peut aussi être classifié comme un type de spotting très reconnaissable puisqu'il correspond à une ceinture blanche sur un fond coloré. La mutation responsable de ce phénotype n'a pas été identifiée chez les bovins de race Dutch Belted ou Belted Galloway, par exemple (Table 1). Cependant le même phénotype belted existe chez le porc et la mutation responsable de ce phénotype semble intervenir dans les parties régulatrices du gène *Kit* (GIUFFRÀ *et al.* 1999) (ligand de c-kit).

Un locus majeur indépendant des autres locus white-spotting est appelé *Brockling* (B_c). La présence de cette mutation en combinaison avec les autres mutations white-spotting produit des points pigmentés dans les zones qui auraient été blanches en l'absence de B_c . Par exemple, un croisement entre Hereford et Angus produit des descendants avec des tâches pigmentées sur la face, normalement blanche en raison de S^h , lorsque l'allèle B_c de l'Angus est présent. Les races qui semblent porter cet allèle B_c sont la Ayshire, la Jersey, la rouge Norvégienne et la Normande (Figure 5). Un des avantages de ce gène pour les animaux de phénotype pie comme la Hereford, est la pigmentation autour des yeux qui forme des lunettes impliquées dans la réduction du risque de cancer des yeux (ANDERSON 1991).

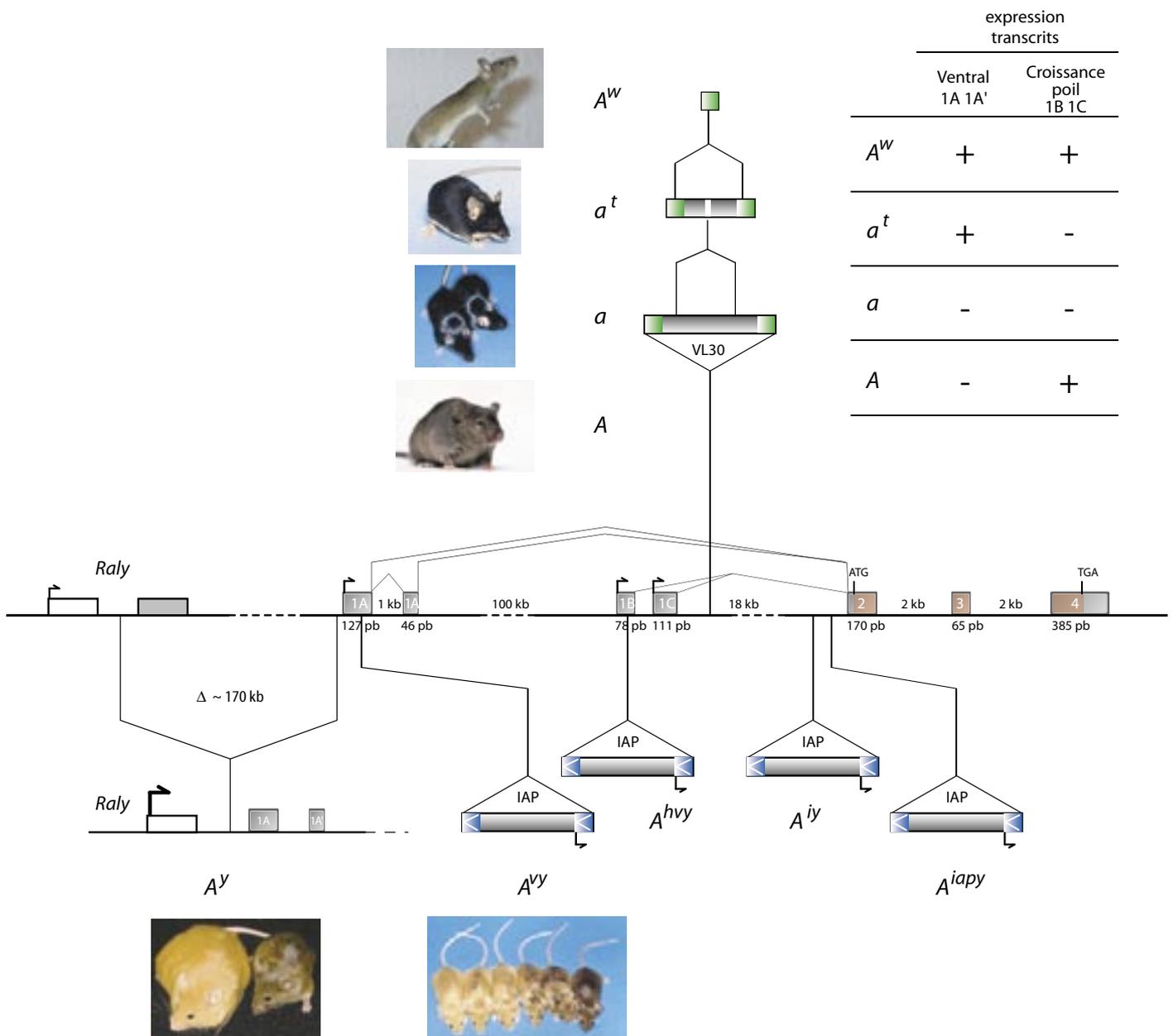


Figure 6 : Le gène Agouti murin et certaines de ses mutations. La partie haute de la figure illustre certaines mutations perte de fonction, alors que la partie basse regroupe les mutations gain de fonction connues.

Le gène *Agouti*

Chez la souris, *Agouti* fait partie des gènes qui comportent le plus d'allèles phénotypiques décrits parmi les gènes de la coloration, juste après le locus *Albino* (*Tyr*) (BENNETT et LAMOREUX 2003). De plus, c'est l'un des rares gènes connus qui favorisent la pheomélanogénèse, mis à part l'allèle *e* de *Mc1r* qui produit un pelage jaune. Ce gène est donc d'un très grand intérêt lorsqu'il s'agit d'expliquer les patrons de coloration pheomélaniques autres que ceux produits par *Mc1r^e*.

Structure du gène

Le gène *Agouti* murin contient trois exons codants qui ont une taille de 170 pb pour l'exon 2 contenant le codon d'initiation de la traduction, 65 pb pour l'exon 3, et 385 pb pour l'exon 4 contenant le codon stop de la traduction et la région 3'UTR (BULTMAN *et al.* 1992; MILLER *et al.* 1993) (Figure 6). Ces trois exons sont interrompus par deux introns d'environ 2 kb. La région génomique régulatrice en 5' de la partie codante est quant à elle beaucoup plus complexe. Quatre exons correspondant à différents 5'UTR dans le transcrit mature sont dispersés sur 120 kb en amont de la partie codante. Un premier promoteur dirigeant l'expression d'*Agouti* dans la partie ventrale chez les souris *A^w/A^w* est responsable de la transcription des exons non codants 1A et 1A' et permet la formation de transcrits alternatifs contenant soit l'exon 1A seul ou les deux exons. Deux autres promoteurs alternatifs existent à environ 100 kb en aval de celui-ci et 18 kb en amont du premier exon codant. Ces deux promoteurs situés avant les exons 1B et 1C s'expriment au cours de la croissance du poil et sont responsables du switch de la mélanogénèse observé entre le quatrième et sixième jour (BULTMAN *et al.* 1992; MILLER *et al.* 1993; VRIELING *et al.* 1994). De nombreuses mutations gain de fonction et perte de fonction de cette région régulatrice existent chez la souris (Figure 6).

La mutation perte de fonction *a* (non-*agouti*) correspond à une insertion de 11,6 kb environ contenant un élément rétroviral murin VL30 de 5,5 kb de long plus une séquence additionnelle de 5,5 kb. Cette mutation empêche l'expression d'*Agouti* aussi bien dans les régions ventrales et dorsales qu'au cours de la croissance du poil. Les souris porteuses de cet allèle à l'état homozygote sont donc entièrement noires (BULTMAN *et al.* 1994). Les souris black-and-tan (*a^t*) sont noires avec un ventre jaune. Elles sont porteuses de l'allèle *a^t* qui possède l'élément VL30 au même endroit que l'allèle *a* non-*agouti* mais ne contient pas la séquence additionnelle de

5,5 kb. Cette différence structurale permet l'expression des transcrits 1A1A' sur la partie ventrale de l'animal tout au long du cycle pileire (VRIELING *et al.* 1994). L'allèle *Agouti* light-bellied (A^w) ne comporte plus qu'un LTR (Long Terminal Repeat) de l'élément VL30 et permet l'expression ventrale et cycle spécifique. Les souris porteuses ont donc un phénotype sauvage avec un ventre clair (VRIELING *et al.* 1994).

L'une des mutations gain de fonction du gène *Agouti* est la mutation Lethal yellow (A^y) (Figure 6). Les souris hétérozygotes développent un pelage jaune uniforme sur tout le corps en raison de la sur-expression d'*Agouti*. En plus de son effet sur la pigmentation, cette mutation est associée à des effets pléiotropes dominants tel qu'un diabète non insulino-dépendant, une hyperglycémie, une obésité, une hyperphagie et une sensibilité accrue aux tumeurs (SIRACUSA 1994). A l'état homozygote, l'allèle A^y provoque la mort des embryons avant l'implantation intra-utérine (BARSH *et al.* 1990). Ces effets pléiotropes sont dus à une sur-expression ectopique d'un transcrit alternatif contenant les parties codantes et 3'UTR normales d'*Agouti* plus une région 5'UTR correspondant au premier exon du gène *Raly* situé en amont d'*Agouti* sur le chromosome 2 murin (MICHAUD *et al.* 1993). La mutation est une délétion de 170 kb environ qui comprend la partie codante de *Raly* et qui place son promoteur à proximité des premiers exons non codants du gène *Agouti* (MICHAUD *et al.* 1994a). En réalité, la létalité embryonnaire associée à A^y est provoquée par la perte de fonction du gène *Raly* qui est normalement exprimé ubiquitairement et code un membre des protéines de liaison aux ARN impliqué dans la maturation des pre-ARN et la régulation du développement (MICHAUD *et al.* 1993).

Un autre groupe de mutations dominantes (A^{vy} , A^{hvy} , A^{iy} , A^{iapy}) consiste en l'insertion de rétrotransposons murin de type IAP (Intracisternal A Particle) (Figure 6). Ces éléments à extrémités répétées de type LTR (Long Terminal Repeat) sont insérés en anti-sens dans la grande région promotrice d'*Agouti* (~120 kb) et sont responsables de l'expression ectopique d'*Agouti* tout comme l'allèle A^y . Les phénotypes d'obésité observés chez ces souris mutantes lorsque les transcrits *Agouti* sont surexprimés démontrent que c'est le produit de ce gène qui est responsable de cette pathologie (SIRACUSA 1994; YEN *et al.* 1994). L'activité mosaïque des promoteurs de ces éléments insérés est responsable des variations phénotypiques observées chez ces mutants. Ces souris sont tachetées ou rayées de noir sur un fond coloré allant du pseudo-agouti (sauvage) au jaune (de type A^y). Les équipes d'Argeson et de Michaud ont mis en évidence les bases moléculaires de cette variabilité phénotypique en découvrant que le

degré de méthylation des parties promotrices des IAP (LTR) des allèles A^{hvy} et A^{iapv} est corrélé à la quantité de noir dans le pelage (ARGESON *et al.* 1996; MICHAUD *et al.* 1994b). En effet, plus ces éléments sont méthylés, moins l'activité promotrice « mutante » due aux LTR est importante, moins le gène *Agouti* est exprimé. Il y a donc moins de pigmentation jaune.

Les éléments murins IAP appartiennent à la classe des rétrotransposons de type LTR mobilisés grâce à un intermédiaire ARN. Ces éléments ont une structure similaire aux rétrovirus, excepté le gène de l'enveloppe, et représentent environ 8% des séquences du génome humain. L'autre classe de rétrotransposons représentant 17% du génome humain est la classe des rétrotransposons non-LTR composée des éléments LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) et SINE (Short Interspersed Nuclear Elements) (DEININGER *et al.* 2003). L'activité potentiellement mutagène des rétrotransposons est réprimée par la méthylation des di-nucléotides CpG (YODER *et al.* 1997). Cette répression est établie grâce à la liaison des protéines de la famille des MBD (Methyl-CpG-binding domain) qui recrute les histones desacetylases et rend la structure de la chromatine transcriptionnellement inactive (BIRD et WOLFFE 1999; HENDRICH et BIRD 1998). Par conséquent, l'hyperméthylation des rétrotransposons est considérée comme un mécanisme de défense majeur des génomes contre ces éléments qui pourraient être très mutagènes s'ils étaient transcrits (WOODCOCK *et al.* 1997; YODER *et al.* 1997). La méthylation de l'ADN fait partie des modifications épigénétiques qui ne sont pas codées par les séquences d'ADN et constitue un degré supplémentaire de régulation des génomes. La perte, apparemment stochastique, des marques épigénétiques a pour conséquence une réactivation transcriptionnelle aléatoire des éléments IAP du gène *Agouti*. Ce phénomène aléatoire est directement visible grâce au pelage des souris A^{vy} . Suite à l'observation de la descendance pseudo-agouti plus importante provenant des mères pseudo-agouti A^{vy} plutôt que des pères A^{vy} , l'équipe de Morgan a démontré que les marques épigénétiques de cet allèle sont hérités après la méiose maternelle (MORGAN *et al.* 1999). Ce résultat offre un aperçu de l'héritabilité des caractères non-mendéliens qui pourrait être répandu en raison du grand nombre de rétrotransposons dans les génomes.

Les effets pléiotropes associés à la sur-expression d'*Agouti*

Les mutants A^y et A^{vy} ont été les plus étudiés en ce qui concerne le phénotype d'obésité. Cela a permis de mieux caractériser les effets physiologiques associés à la sur-expression d'*Agouti*. Ces mutants ont une forme de diabète de type II caractérisée par une résistance à l'insuline (FRIGERI *et al.* 1983; SALEM *et al.* 1989; SALEM et WOLFF 1989), une hypertrophie et hyperplasie des îlots pancréatiques (HELLERSTROM et HELLMAN 1963; WARBRITTON *et al.* 1994), une hyperinsulinémie (FRIGERI *et al.* 1983; SALEM *et al.* 1989; SALEM et WOLFF 1989; WOLFF *et al.* 1990) et une tolérance au glucose diminuée (FRIGERI *et al.* 1988). En plus des syndromes d'obésité et de diabète, les souris $A^y/-$ et $A^{vy}/-$ ont un développement musculaire et squelettique plus grand que la normale et un plus grand risque de développement d'hyperplasie ou de néoplasie dans de nombreux tissus (WOLFF *et al.* 1986) qui peuvent conduire au développement de tumeurs. Comme ces mutants présentent des changements de structure de la région génomique en 5' de la partie codante d'*Agouti* qui pourraient être responsables de ces syndromes, Klebig et ses collaborateurs ont réalisés des souris transgéniques qui expriment l'ADNc d'*Agouti* de manière ectopique. Ils ont alors observé une expression d'*Agouti* dans tous les tissus examinés ainsi que le développement d'un pelage jaune, une obésité et une hyperinsulinémie. Ils en ont donc conclu que l'expression ectopique d'*Agouti* est responsable des traits phénotypiques dominant des souris « obese yellow » (KLEBIG *et al.* 1995). Par ailleurs, ces effets ne sont pas un résultat secondaire de la production de pheomélanines, puisque les souris mutantes pour le gène *Mc1r*, qui ont un pelage jaune, ne sont pas obèses (MANNE *et al.* 1995). Une autre étude, par le biais de souris transgéniques, a montré que l'expression d'*Agouti* dans les adipocytes seulement n'est pas suffisante pour induire une obésité mais nécessite l'administration d'insuline (MYNATT *et al.* 1997). La protéine Agouti stimule la lipogenèse des adipocytes grâce à une augmentation de l'activité de la FAS (Fatty Acid Synthase), l'enzyme clé de la synthèse des triglycérides, par une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (JONES *et al.* 1996; KIM *et al.* 1997; KIM *et al.* 1996). Cette augmentation de calcium intracellulaire a aussi lieu dans les îlots β pancréatiques et stimule la sécrétion d'insuline (XUE *et al.* 1999). Par ailleurs, la protéine Agouti sensibilise les adipocytes à l'action de l'insuline par le biais des facteurs de transcription PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor), STAT1 et 3 (signal transducers and activators of transcription) (MYNATT et STEPHENS 2001; MYNATT et STEPHENS 2003). L'action d'Agouti sur les adipocytes ne se produit pas par l'intermédiaire du récepteur *Mc1r* mais grâce au *Mc2r*,

appartenant à la même famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G comprenant cinq membres connus. Le Mc1r est spécifique des mélanocytes, alors que le Mc2r s'exprime dans les adipocytes et les surrénales, le Mc3r dans le cerveau, le placenta et le pancréas, le Mc4r dans le cerveau, les muscles et les adipocytes et le Mc5r dans la plupart des tissus (VOISEY et VAN DAAL 2002).

Outre les effets périphériques d'Agouti, la fonction d'antagoniste de Mc4r exprimée dans le système nerveux central a conduit à la découverte de l'antagoniste naturel de ce récepteur qui est un gène homologue à *Agouti* (OLLMANN *et al.* 1997; SHUTTER *et al.* 1997). *Agrp* (Agouti related protein) antagonise les récepteurs Mc3r et Mc4r dans l'hypothalamus (OLLMANN *et al.* 1997) et stimule la prise alimentaire (ROSSI *et al.* 1998).

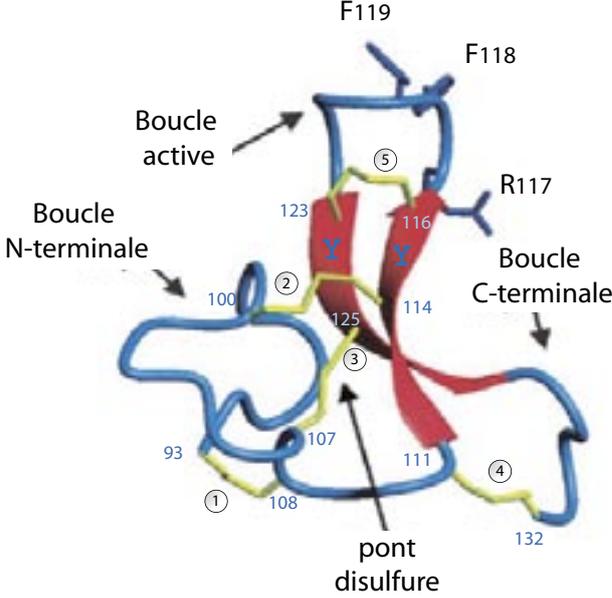
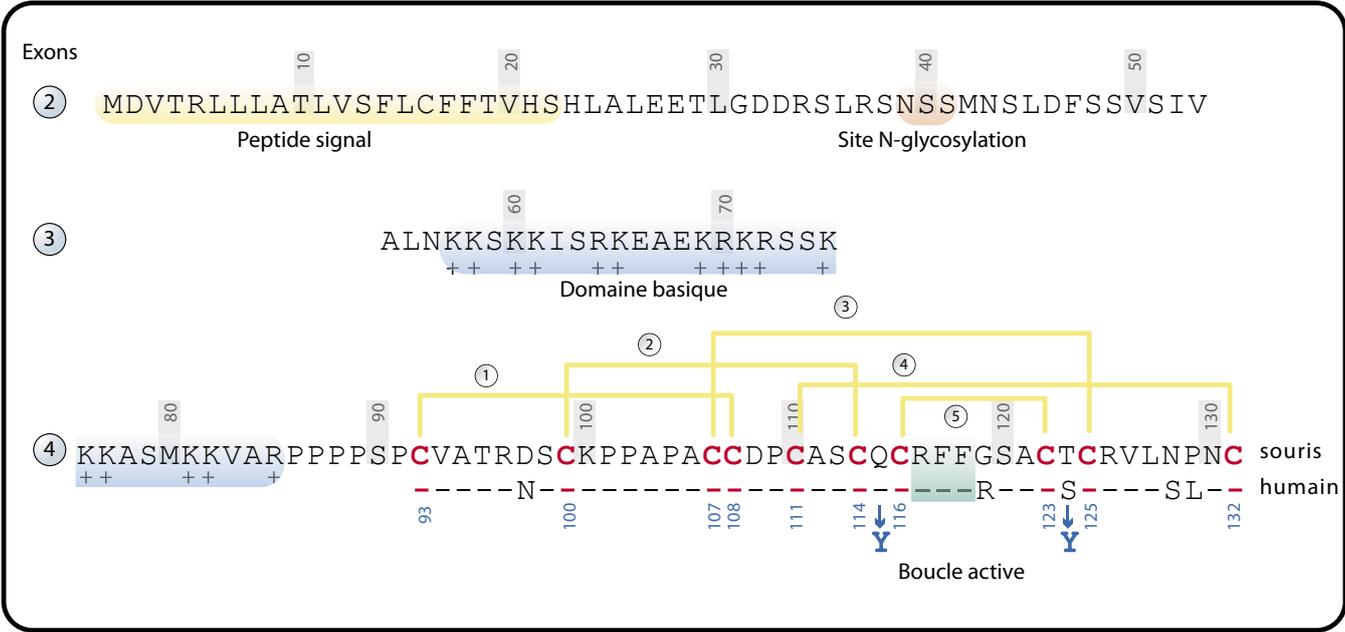


Figure 7 : Structure de la protéine Agouti. L'encadré contient la séquence peptidique annotée de la protéine murine ainsi que la partie C-terminale de la protéine humaine. Les cinq ponts disulfures impliqués dans le repliement de la protéine sont représentés en jaune. Dessous, la structure moléculaire tridimensionnelle de la partie C-terminale de la protéine Agouti humaine est représentée sous la forme cis (d'après (MCNULTY et al. 2005)).

Structure de la protéine Agouti

Malgré sa structure génétique complexe, le locus *Agouti* code une petite protéine de 131 acides aminés. La protéine Agouti possède les caractéristiques structurales d'une protéine sécrétée avec un peptide signal hydrophobe et aucune séquence correspondant à un domaine transmembranaire. Les caractéristiques structurales majeures de la protéine mature sont un domaine N-terminal riche en acides aminés basiques, un domaine central riche en Prolines, et un domaine C-terminal riche en résidus Cystéines (BULTMAN *et al.* 1992) (Figure 7). Les analyses biochimiques de la protéine Agouti ont démontré qu'elle est N-glycosylée sur le site N39 (WILLARD *et al.* 1995). La substitution de l'asparagine 39 par un acide aspartique abolit partiellement la fonction de la protéine dans des expériences de transgénèse chez la souris (PERRY *et al.* 1996). De plus, elle est résistante à la dénaturation par la chaleur et forme une certaine proportion de dimères lorsque la protéine est exprimée dans des cellules d'insectes infectées par le baculovirus porteur de l'ADNc d'Agouti (WILLARD *et al.* 1995). Cette résistance à la dénaturation est conférée par la structure tridimensionnelle adoptée par le domaine C-terminal (PERRY *et al.* 1996). L'espacement entre les dix résidus cystéines dans le domaine C-terminal est très conservé par rapport aux toxines de serpents et d'araignées (conotoxin et plectoxin), ce qui suggère que la protéine Agouti doit avoir la même structure tridimensionnelle grâce à la formation de cinq ponts disulfures entre les dix cystéines (WILLARD *et al.* 1995). En effet, la mutagenèse d'une cystéine impliquée dans la formation des ponts disulfures 1, 2, 3, ou 5 abolit complètement la fonction d'Agouti lors d'expériences de transgénèse chez la souris (PERRY *et al.* 1996). En revanche, la mutation d'une des cystéines du pont disulfure 4 (Figure 7) n'a qu'un effet partiel sur la réduction de l'activité de la protéine puisque les souris transgéniques exprimant ces protéines mutantes ont un ventre jaune et le dos noir. Ceci a conduit les auteurs de ce travail à conclure que les mélanocytes ventraux sont plus sensibles à Agouti que les dorsaux puisqu'ils sont influencés par une protéine dont la structure est moins stable (PERRY *et al.* 1996).

Un des résultats surprenant de ce même travail effectué grâce à des souris transgéniques est l'absence d'effet lorsque le domaine basique, conservé chez différentes espèces (KWON *et al.* 1994; OLIVERA *et al.* 1994; WILSON *et al.* 1995), est délété. Cela indique que les résidus basiques du domaine central de la protéine ne sont pas impliqués dans la liaison au Mc1r ou Mc4r, mais plutôt que cette partie de la protéine pourrait être utile pour la solubilité de la protéine et/ou

son transport au cours de la sécrétion (PERRY *et al.* 1996) ou pour les interactions protéine-protéine (MILTENBERGER *et al.* 1999). Une partie de la structure tridimensionnelle de la protéine Agouti a été récemment résolue (McNULTY *et al.* 2005). Comme le domaine C-terminal conserve son activité d'antagoniste sur les récepteurs aux mélanocortines (WILLARD *et al.* 1995), les auteurs ont synthétisé la protéine Agouti humaine (ASIP), qui n'a que 5 acides aminés de différence avec la protéine murine, du résidu 93 à 132 (Figure 7). Ils se sont aperçus que ce peptide n'était pas soluble. Ils ont donc étendu le peptide synthétique de 13 résidus en N-terminal (80 à 132) pour inclure une partie du domaine basique et augmenter la solubilité de la protéine. Ceci confirme que si le domaine basique n'est pas impliqué dans des interaction avec le Mc1r, il est néanmoins nécessaire pour la formation d'une protéine fonctionnelle. Le domaine C-terminal résolu par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) est organisé en deux feuillets β anti-parallèles, deux boucles N et C-terminales et une boucle entre les deux feuillets β qui porte les trois résidus Arg117, Phe118, Phe119 reconnaissant un site transmembranaire chargé négativement des récepteurs aux mélanocortines (HASKELL-LUEVANO *et al.* 2001; WILCZYNSKI *et al.* 2004; YANG *et al.* 2000) (Figure 7). Mais l'un des résultats majeur de McNulty et ces collaborateurs est que la protéine Agouti existe sous forme de deux conformères *cis* et *trans* (approximativement 35% *cis* et 65% *trans*) grâce à la liaison peptidique entre Pro102 et Pro103 qui est sous forme *cis* et permet à la liaison peptidique suivante (Ala104-Pro105) d'exister sous forme *cis* ou *trans* (McNULTY *et al.* 2005). Lorsque Agouti est sous forme *cis* (la liaison A104-P105 en *cis*), elle est plus repliée avec la boucle N-terminale qui vient au contact du feuillet β . La forme *trans* quant à elle a une structure moins compacte avec son domaine N-terminal éloigné du centre de la protéine. Les auteurs ont démontré que le conformère *cis* est la protéine biologiquement active qui peut antagoniser les récepteurs aux mélanocortines (McNULTY *et al.* 2005). Quant au conformère *trans* de la protéine, sa fonction reste à élucider.

Partenaires d'Agouti

La protéine Agouti, pour jouer son rôle d'antagoniste de la fixation de l' α -MSH, doit se fixer sur le Mc1r. Si l' α -MSH est une hormone circulante, la protéine Agouti a un degré d'action limité, au point que son action est considérée comme paracrine. Jusqu'à présent, peu de résultats expérimentaux permettent d'expliquer pourquoi cette protéine sécrétée par les follicules pileux reste localisée à proximité des mélanocytes. Les fonctions des produits des gènes

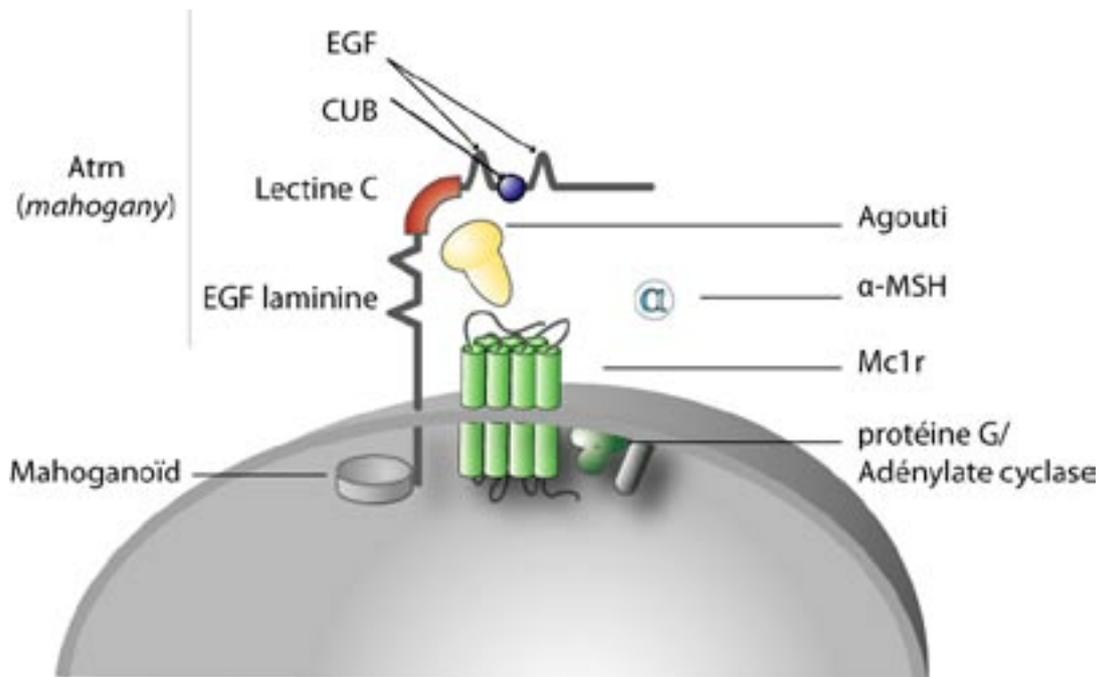


Figure 8 : Interactions des protéines Attractine, Agouti et Mc1r. L'attractine est un co-récepteur transmembranaire de la protéine Agouti pour sa fixation sur le récepteur à sept domaines transmembranaires Mc1r. En absence d'Agouti, le Mc1r est stimulé par l' α -MSH. Grâce à une protéine G et une Adénylate cyclase, la fixation de l' α -MSH active la voie de l'AMPc.

Mahogany et *Mahoganoïd*, suppresseur de la fonction d'*Agouti*, ont récemment été mises en évidence (HE *et al.* 2001; HE *et al.* 2003). Le gène *Mahogany* (ou *Attractine* chez l'homme, *Atrn*) murin est composé de 30 exons répartis sur 160 kb environ (NAGLE *et al.* 1999). L'ARNm du gène *Mahogany* fait environ 9 kb et code une protéine transmembranaire de type I de 1429 acides aminés (GUNN *et al.* 1999). Le domaine extracellulaire de la protéine prédite est identique à 93 % à l'*Attractine*, une glycoprotéine sérique humaine sécrétée par les cellules T activées qui a été impliquée dans la dispersion des monocytes et le rassemblement des cellules T, et qui est codée par un ADNc de 4 kb (DUKE-COHAN *et al.* 1998). Le gène *Attractine* humain contient un élément LINE inséré dans un exon en amont de la séquence correspondante au domaine transmembranaire de la protéine, qui contient un codon stop et un signal de polyadénylation responsables de l'expression de la forme soluble de la protéine *Attractine* (1336 aa). La partie extracellulaire de la protéine *attractine* murine et humaine contient deux domaines EGF (Epidermal Growth Factor) qui entourent un domaine CUB fréquemment observé dans les glycoprotéines, puis un domaine de type lectine C dans la partie centrale, et enfin deux domaines EGF de type laminine à proximité de la partie transmembranaire de la protéine (GUNN *et al.* 1999) (Figure 8). Ces caractéristiques structurales font de cette protéine prédite un candidat pour la fixation de la glycoprotéine *Agouti*. De plus, *Attractine* est largement exprimé dans la

peau, le cerveau, le cœur, les reins, le foie et les poumons (DUKE-COHAN *et al.* 1998; GUNN *et al.* 1999; NAGLE *et al.* 1999). He et son équipe ont confirmé cette hypothèse en montrant l'interaction directe entre l'Attractine et le domaine basique et N-terminal de la protéine Agouti (HE *et al.* 2001) (Figure 8). Par conséquent, Attractine est un co-récepteur du Mc1r pour la fixation de la protéine Agouti. Ainsi, le co-récepteur Attractine permettrait d'augmenter la concentration en protéine Agouti à proximité du récepteur aux mélanocortines. L'absence de ce co-récepteur réduit la fixation d'Agouti sur Mc1r et supprime les effets secondaires liés à la sur-expression d'Agouti chez les souris *A^y* (MILLER *et al.* 1997). Par ailleurs, la partie intracytoplasmique de l'Attractine est très conservée entre les espèces et pourrait avoir une fonction de signalisation inconnue pour le moment. En effet, la protéine Mahoganoïd, comme l'Attractine, est nécessaire à la fonction d'Agouti et contient un domaine RING ayant une activité E3 ubiquitin ligase *in vitro*. Les similarités phénotypiques, transcriptionnelles et d'interactions génétiques avec *Agouti* suggèrent que Mahoganoïd et Attractine font parties de la même voie de régulation du renouvellement des protéines (HE *et al.* 2003).

Objectif et stratégie de recherche

La thématique de recherche mise en place dans l'unité coloration de l'UMR 1061 (INRA/ Université de Limoges) consiste en la recherche de marqueurs moléculaires utilisables dans des applications de traçabilité des produits d'origine bovine. La démarche repose sur l'étude des bases moléculaires responsables du patron de coloration de la robe bovine. En effet, le patron de coloration de chaque race, fruit du travail des sélectionneurs depuis de nombreuses générations, est un caractère phénotypique inscrit au Herd-book de chaque race et constitue un des critères majeurs pour identifier l'origine raciale d'un individu. Puisque chaque race bovine est caractérisée par une couleur de robe qui lui est propre, il doit exister des allèles (ou mutations) spécifiques des gènes de la coloration bovine. Dans cette démarche, mon travail s'est porté sur l'étude du gène *Agouti* bovin pour permettre la différenciation génotypique des races bovines porteuses de l'allèle sauvage du *Mc1r* (E^+/E^+).

Un premier travail au laboratoire avait mis en évidence la structure génomique de la partie codante du gène *Agouti* bovin. La première approche de séquençage des parties codantes d'*Agouti* chez différentes races n'a pas permis d'identifier de mutations spécifiques. Mon travail a consisté alors en l'identification des parties promotrices du gène. Je me suis également intéressé à la régulation transcriptionnelle au niveau de la peau de différentes races bovines, dont la race Normande de génotype *Extension* sauvage (E^+/E^+) qui a un phénotype caractéristique appelé bringé. Enfin, l'expression de la protéine Agouti a été étudiée.

Matériels et Méthodes

Matériel biologique

Les échantillons bovins ont été prélevés 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 et la Normande. Les prélèvements de peaux (généralement 25 cm²) et différents tissus (coeur, foie, poumons) ont été effectués après abattage. Après lavage à l'éthanol et rinçage à l'eau, les échantillons sont conservés à 4°C s'ils sont traités dans les 48 heures après abattage ou congelés à -80°C si le traitement est plus tardif.

Nous disposons de deux antisérums polyclonaux de lapin générés contre, un peptide synthétique ($_{\text{H}_2\text{N}}\text{-RNE AEK KKR PSK RKA C-CONH}_2$) correspondant au domaine basique de la protéine Agouti bovine, et un autre ($_{\text{H}_2\text{N}}\text{-FRS ACS CRV LNP TC-CONH}_2$) correspondant à l'extrémité C-terminale. Pour révéler la présence de ces anticorps, un anticorps secondaire porc-anti lapin couplé à la peroxydase (POD)(DAKO) a été utilisé. Les quantités relatives de protéines détectées par western blot ont été estimées grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la β -Tubuline (Oncogene™).

Méthodes

Préparations et traitements des ARN totaux

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 mm^2 , 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. 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). Le marqueur utilisé est le RNA 6000 Ladder (Ambion).

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir de $1\text{ }\mu\text{g}$ d'ARN totaux de peau traités à la DNase, dans un volume final de $20\text{ }\mu\text{L}$, avec $0,5\text{ }\mu\text{g}$ 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.

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, des amorces choisies dans le gène d'intérêt (GSP1 (Gene-Specific Primer 1) et GSP2 (Gene-Specific Primer 2) couplées aux amorces UPM (Universal Primer Mix) et NUP (Nested Universal Primer), respectivement, permettent d'amplifier, grâce à deux réactions de PCR successives, les régions 5' et 3' UTRs du gène d'intérêt.

Les RT-PCR semi quantitatives 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 triplicatas 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 $25\text{ }\mu\text{L}$. 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*, *DCT*, *Agouti*), un couple d'oligonucléotides est choisi préférentiellement dans la région proche de la queue poly-A du transcrit d'intérêt. Ces oligonucléotides sont

dessinés grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer). Ces différents couples d'amorces sont 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 signal de fluorescence optimal. Pour cela, les solutions mères à 100 µM sont diluées à deux concentrations différentes : 7,5 µM et 0,625 µM. 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. 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 :

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

Tous les résultats sont représentés en considérant la région noire de la Prim'Holstein comme référence biologique. 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.

Analyses des acides nucléiques

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.

Le système d'extraction commercialisé par Qiagen (QIAquick gel extraction Kit, Qiagen, France) a été utilisé pour purifier les fragments de tailles allant de 40 pb à 10 kb après migration sur gel. Son principe repose sur l'adsorption de l'ADN sur un gel de silice.

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon la méthode de Sanger à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer). Les réactions de séquençage d'ADN 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 $MgCl_2$ et l'ADN polymérase (*Taq* FS) ainsi que 15 pmol d'amorce. Vingt cinq cycles sont réalisés dans un volume final de 20 μ L : 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 μ L d'isopropanol 75%, lavé par 250 μ L d'isopropanol 75% afin d'éliminer les réactifs non utilisés qui pourraient perturber la migration, séché puis repris dans 20 μ L de TSR (Template Sequencing Reagent) avant d'être dénaturé à 96°C pendant 5 min.

Les hybridations moléculaires d'ADN (Southern blot) ont été réalisées après électrophorèse en gel d'agarose 0,8% (TBE : Tris 89 mM, Borate 89 mM, EDTA 2 mM pH 8), dépurination (HCl 0,125 N / 15 min), dénaturation (NaOH 0,4 N / 15 min), neutralisation (TrisHCl 1M pH 7,4 / 15 min), transfert par capillarité (SSC 10X : NaCl 1,5 M, Tri-Sodium Citrate 150 mM, pH 7) sur une membrane (Hybon-XL, Amersham) et fixation aux UV (0,125 mJ, UV Stratalinker). Les hybridations moléculaires d'ARN (Northern blot) ont été réalisées après dénaturation des ARN (55°, 5min), migration dans un gel d'agarose 1,2 % (MOPS 1X, formaldéhyde 0,6 %, H_2O DEPC, Bromure d'éthyidium 10 μ g), transfert par capillarité (SSC 10X) et fixation aux UV.

Le kit « Random Primers DNA Labelling System » (Life Technologies) a été utilisé pour le marquage radioactif des sondes d'ADN. Cette méthode est valable pour des fragments de plus de 50 nucléotides et permet de marquer 25 ng d'ADN avec une activité spécifique d'environ 10^9 dpm/ μ g. Les fragments d'ADN utilisés pour le marquage (25 à 50 ng dans un volume inférieur à 25 μ l) sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min. Le fragment dénaturé est mis en présence d'un mélange d'héxanucléotides (15 μ l) qui servent d'amorces pour la synthèse de la sonde par le fragment de Klenow qui incorpore les désoxynucléotides (0,4 mM final) et le [α - 32 P]dCTP (2,5 μ l soit 2,5 μ Ci au final). Après une incubation de 1 h à 25°C et la dénaturation, la sonde est incorporée au tampon d'hybridation (ExpressHyb Hybridization

Solution, BD Biosciences Clontech). Les membranes sont incubées à 65°C (four à hybridation rotatif, Appligène) toute une nuit, puis lavées grâce à trois tampons de stringence croissante (SSC 2X ; 1X ; 0,1X et 0,1% SDS). Pour finir, l'hybridation de la sonde radiomarquée spécifique est révélée (PhosphorImager™ 445SI, Molecular Dynamics).

Analyses des protéines

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 morceaux d'environ 1 mm², puis broyé (FastPrep® FP220A, kit FastRNA® Pro Green Kit, Q-BIOgene) dans un tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 ; 0,01% SDS ; Nonidet P-40 1%) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (ovomucoïd 200 mg/L ; leupeptine 12 mg/L). Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à 12000g et le surnageant est récupéré et stocké à -20°C. La concentration des protéines est mesurée selon la méthode de Bradford (protein assay dye reagents, BIO-RAD S.A., Allemagne). La BSA (Albumine Sérique Bovine) a été utilisée comme protéine standard.

La séparation des protéines en fonction de leur taille est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), selon la méthode de Laemmli. Les gels sont composés d'une fraction séparatrice (acrylamide/bisacrylamide 15%; Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 25%; SDS 0,1%; TEMED 0,04% ; APS 0,1%) et d'une fraction concentratrice (acrylamide/bisacrylamide 5% ; Tris-HCl 1 M, pH 6,8 12% ; SDS 0,1% ; TEMED 0,04% ; APS 0,1%). Les échantillons repris dans le tampon de charge (2X : Tris-HCl 10 mM, pH 8 ; Glycérol 5% ; SDS 2,5% ; β -mercaptoéthanol 5% ; Bleu de bromophénol 0,005%) sont dénaturés (96° / 5 min) avant d'être déposés sur les gels SDS-PAGE. La migration s'effectue à environ 20 mA (Mighty Small II Hoefer Scientific Instruments) dans un tampon de migration Tris-Glycine 1X (Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 250 mM ; SDS 0,1%).

Le transfert des protéines du gel vers une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) est réalisé dans un tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM ; Glycine 39 mM ; SDS 1,3 mM ; Méthanol 20 % ; pH 9,2) grâce à un champ électrique (200 mA / 40 min). Après le transfert, la membrane est colorée 10 minutes au rouge Ponceau afin de visualiser les protéines, puis rincée abondamment à l'H₂O mQ.

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% (Roche), est ensuite conduite pendant 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.

La révélation des Westerns blots 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' H_2O_2 . 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.

Résultats

Le gène *Agouti* bovin est exprimé grâce à trois promoteurs alternatifs

Introduction

Chez la souris, le gène *Agouti* est responsable du switch de la synthèse de l'eumélanine vers la pheomélanine. Il est exprimé dans la peau et produit la bande jaune sub-apicale au cours de la croissance du poil chez la souris sauvage. Les mutations dominantes provoquant l'expression ectopique de la protéine *Agouti* sont responsables du syndrome d'obésité, observé chez les souris *A^y/-* par exemple. Contrairement à la souris, le gène *Agouti* humain est exprimé dans la peau, le cœur, les reins, le foie, les testicules et ovaires, et les adipocytes. Ce patron d'expression du gène humain n'est pas responsable de syndrome d'obésité. Selon ces observations, le gène murin a un rôle physiologique limité à la pigmentation, alors que le gène humain pourrait être impliqué dans d'autres fonctions physiologiques en plus de la pigmentation.

Le but du travail présenté dans l'article qui suit (« Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters ») était de déterminer le patron d'expression du gène *Agouti* bovin.

Le séquençage du gène *Agouti* bovin, son expression et la comparaison avec ses gènes orthologues sont présentés dans cet article.

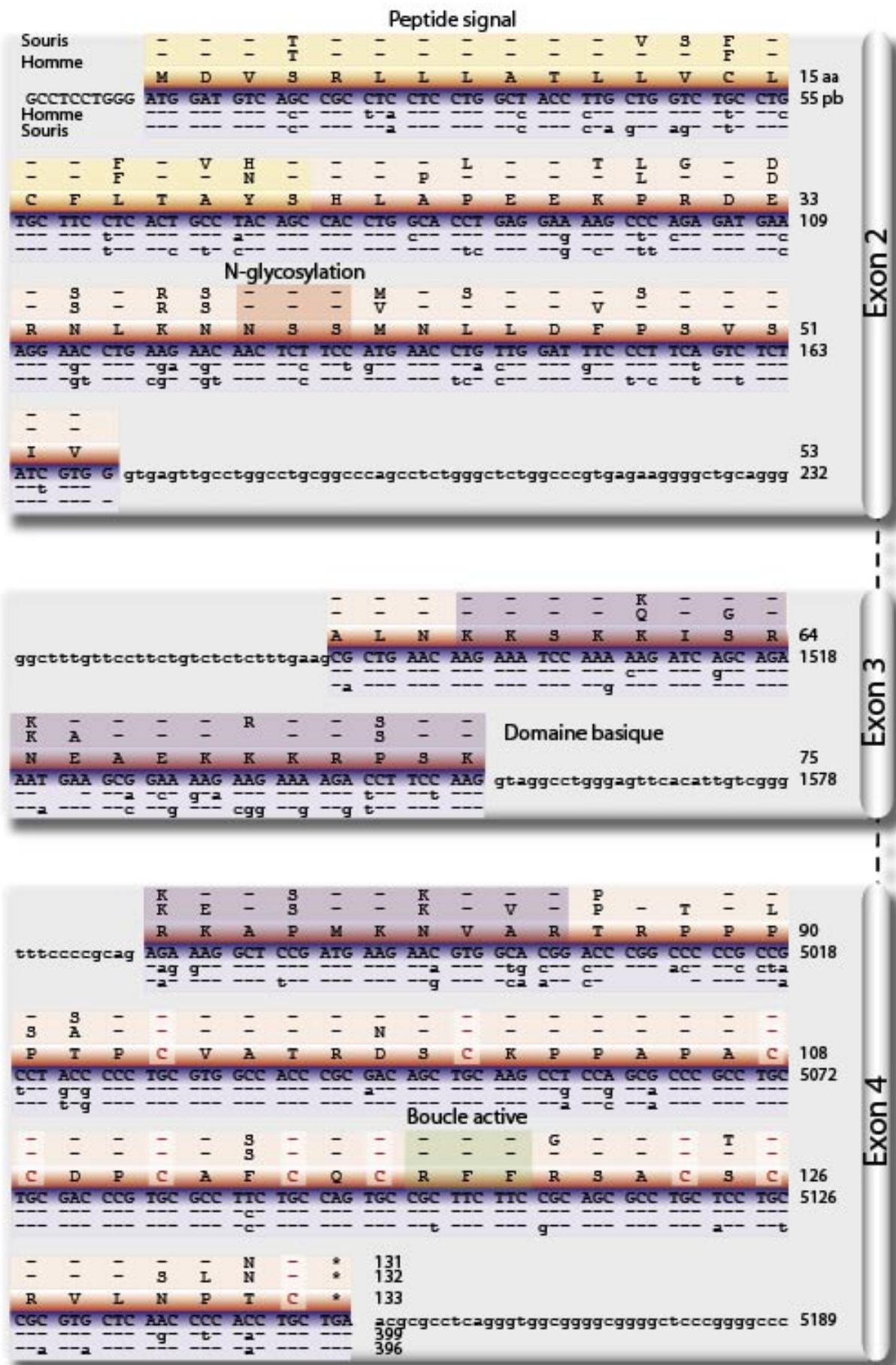


Figure 9: Alignement des séquences codantes bovine, murine et humaine du gène *Agouti* et de leurs protéines. Les exons correspondant aux séquences présentées sont indiqués à droite. Les domaines caractéristiques de la protéine *Agouti* sont indiqués sur les séquences.

Résultats et discussion

Le séquençage de la partie codante du gène *Agouti* bovin a révélé une structure génomique très conservée par rapport aux séquences humaine et murine. Le découpage exon-intron est le même chez les trois espèces. Le gène bovin possède les sites donneurs (gt) et accepteurs (ag) nécessaires à l'épissage des exons 2, 3 et 4 (Figure 9). La séquence codante de l'ADNc bovin (402 pb) possède un et deux codons supplémentaires par rapport à l'homme et la souris respectivement. La conservation au niveau nucléotidique est de 85 et 84 % d'identité par rapport à l'homme et la souris. Cette séquence produit une protéine putative de 133 acides aminés qui est conservée à 75 et 78 % par rapport à la protéine humaine (132 aa) et murine (131 aa). Les structures caractéristiques de la protéine *Agouti* se retrouvent dans la protéine bovine. Le peptide signal est similaire avec des changements d'acides aminés qui ne modifient pas la nature hydrophobe de cette séquence à l'exception d'une cystéine à la place d'une phénylalanine en position 14 (Figure 9). La séquence putative de N-glycosylation (NSS) est conservée, ce qui suggère que la glycosylation est importante pour la fonction d'*Agouti*. Le domaine basique (correspondant à l'exon 3 et le début de l'exon 4) perd un acide aminé basique (15 charges positives) par rapport à la protéine murine (16 charges positives) alors que la protéine humaine en a perdu trois (13 charges positives) (Figure 9). Sachant que ce domaine est impliqué dans les interactions avec le co-récepteur *Attractine*, le nombre de charges positives pourraient avoir une importance pour l'affinité de liaison entre ces deux protéines (He *et al.* 2001). Les deux acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine murine se retrouvent dans le domaine de liaison, composé majoritairement de prolines, entre le domaine basique et le domaine C-terminal. Ce domaine de liaison est important pour la conformation d'*Agouti*. Deux résidus supplémentaires sont aussi présents dans le domaine de liaison humain, donc la protéine bovine pourrait avoir une structure proche de la protéine humaine. Les trois acides aminés (RFF) du site actif sont très conservés. Enfin, le nombre et la disposition des dix cystéines du domaine C-terminal sont conservés. La protéine bovine possède donc toutes les caractéristiques structurales d'une protéine *Agouti* fonctionnelle.

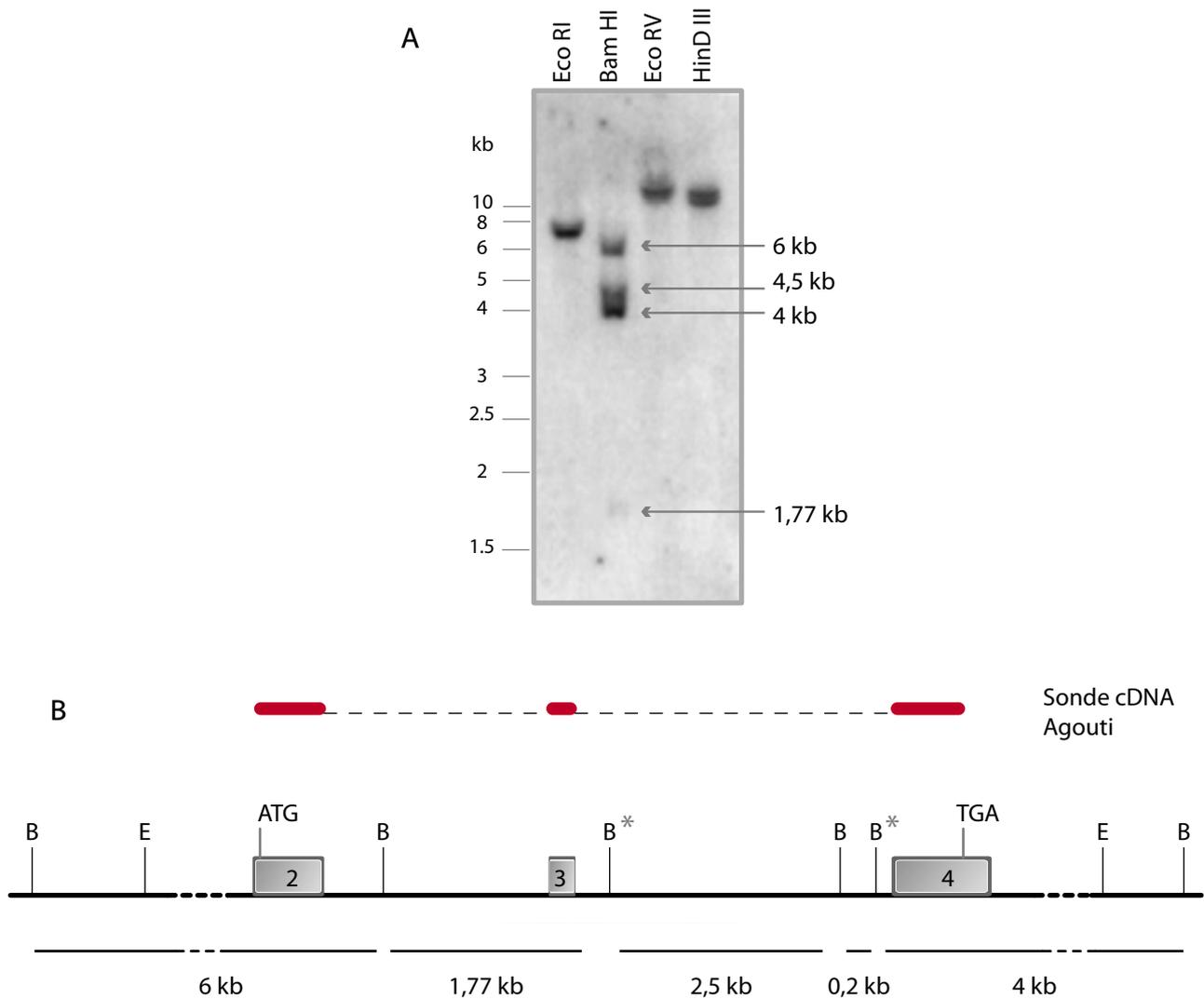


Figure 10: Analyse par Southern blot du gène *Agouti* bovin. (A) Hybridation d'ADN génomique bovin digéré par les enzymes de restriction *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRV* et *HindIII*, avec une sonde correspondant à la partie codante d'*Agouti*. (B) Carte de restriction du gène *Agouti*. B : site *BamHI*; E : site *EcoRI*. * : sites probables digérés partiellement.

Tout comme chez l'humain, nous n'avons pas identifié de mutations dans les parties codantes du gène bovin. Ce résultat nous a conduit à rechercher les parties régulatrices du gène dans le but d'identifier des mutations qui pourraient modifier son expression.

L'hybridation des transcrits *Agouti* par Northern blots a montré que le gène bovin est exprimé dans le cerveau, le coeur, les poumons, le foie, les rein, la rate et la peau. De plus Sumida et ses collaborateurs ont montrés par RT-PCR qu'il est aussi exprimé dans les adipocytes (SUMIDA *et al.* 2004). La présence de transcrits *Agouti* dans le cerveau est surprenante, puisque l'expression ectopique de la protéine *Agouti* chez la souris est responsable des effets pléiotropes observés chez le mutant *A^y*. En effet, l'expression d'*Agouti* dans l'hypothalamus antagonise le *Mc4r* et

augmente la prise alimentaire responsable de la prise de poids (VOISEY and VAN DAAL 2002). Par ailleurs, nous savons que le bovin possède un gène *Agrp* (Oulmouden, resultats non publiés). Ceci suggère que l'expression d'*Agouti* dans le cerveau ne sert pas à remplacer la fonction d'*Agrp*. L'expression d'*Agouti* dans les adipocytes de souris transgéniques et l'injection conjointe d'insuline provoquent une obésité (MYNATT *et al.* 1997). Donc l'expression dans les adipocytes bovin est particulièrement intrigante. L'une des hypothèses que l'on peut formuler est que contrairement à ce qui est admis chez la souris, où *Agouti* aurait un rôle physiologique limité à la pigmentation, la protéine *Agouti* chez le bovin, l'humain et le porc, pourrait jouer le rôle de régulateur de l'adipogenèse dans les tissus périphériques tout comme *Agrp* dans le système nerveux central.

Nous avons mis en évidence trois transcrits alternatifs possédant des parties 5'UTRs différentes. Dans le but de déterminer si ces trois transcrits provenaient d'un seul gène, nous avons réalisé des hybridations par Southern blots (Figure 10). Les digestions d'ADN génomique bovin par les enzymes de restriction *EcoRI*, *EcoRV* et *HinDIII* produisent une seule bande, d'environ 7, 12 et 11 kb respectivement, après hybridation de la sonde *Agouti* bovine correspondante à la partie codante de l'ADNc (Figure 10). La séquence génomique allant de l'exon 2 à 4 a une taille de 5139 pb. Ces trois enzymes coupent à l'extérieur de la partie codante du gène *Agouti* bovin. L'enzyme *BamHI*, quant à elle, produit quatre fragments de restrictions, d'environ 6, 4.5, 4 et 1.7 kb, reconnus par la sonde correspondant à la partie codante du gène (Figure 10). Un site de restriction par *BamHI* dans l'intron 2 (entre les exons 2 et 3), et trois sites dans l'intron 3 (entre les exons 3 et 4), ont été identifiés dans la séquence génomique du gène *Agouti*. La bande de 6 kb correspond au fragment d'ADN contenant l'exon 2. La bande de 1,7 kb correspond au fragment contenant l'exon 3. Cette bande est faible sur le Southern blot, ce qui peut être due à une digestion partielle d'un des sites *BamHI* de part et d'autre de l'exon 3. La digestion partielle ne peut pas intervenir sur le site *BamHI* dans l'intron 2 puisqu'il n'y a pas de bande au dessus de 6 kb. Donc le site en aval de l'exon 3 a du subir une digestion partielle qui pourrait produire la bande de 4,5 kb sur le blot lorsque le site *BamHI* suivant est coupé (Figure 10). Une bande proche de 4,5 kb pourrait être produite si le site en amont de l'exon 4 est digéré partiellement. L'identification de toutes les bandes du profil de restriction par *BamHI* permet de conclure qu'il n'y a qu'une seule séquence génomique contenant les trois exons de la partie codante du gène *Agouti* bovin. Par conséquent, les trois transcrits identifiés proviennent du même gène *Agouti* bovin.

Partie 5'UTR
du transcrit A.

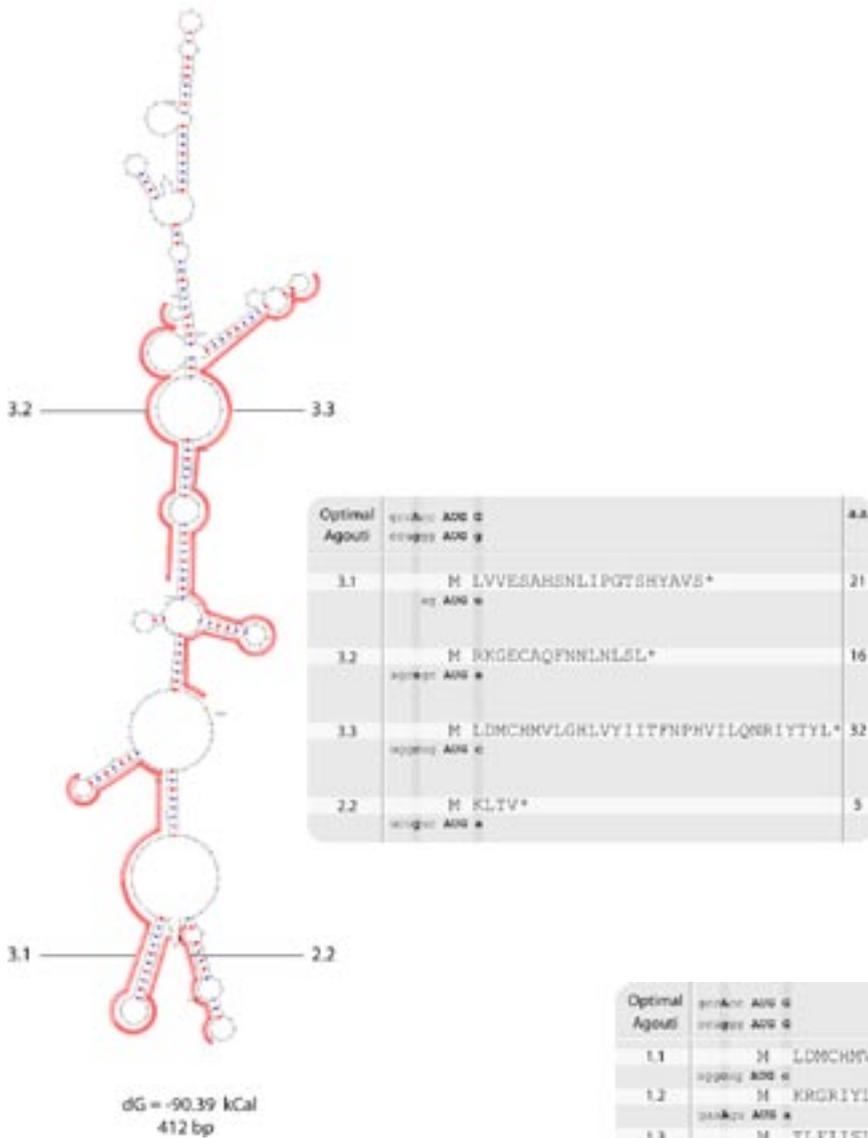
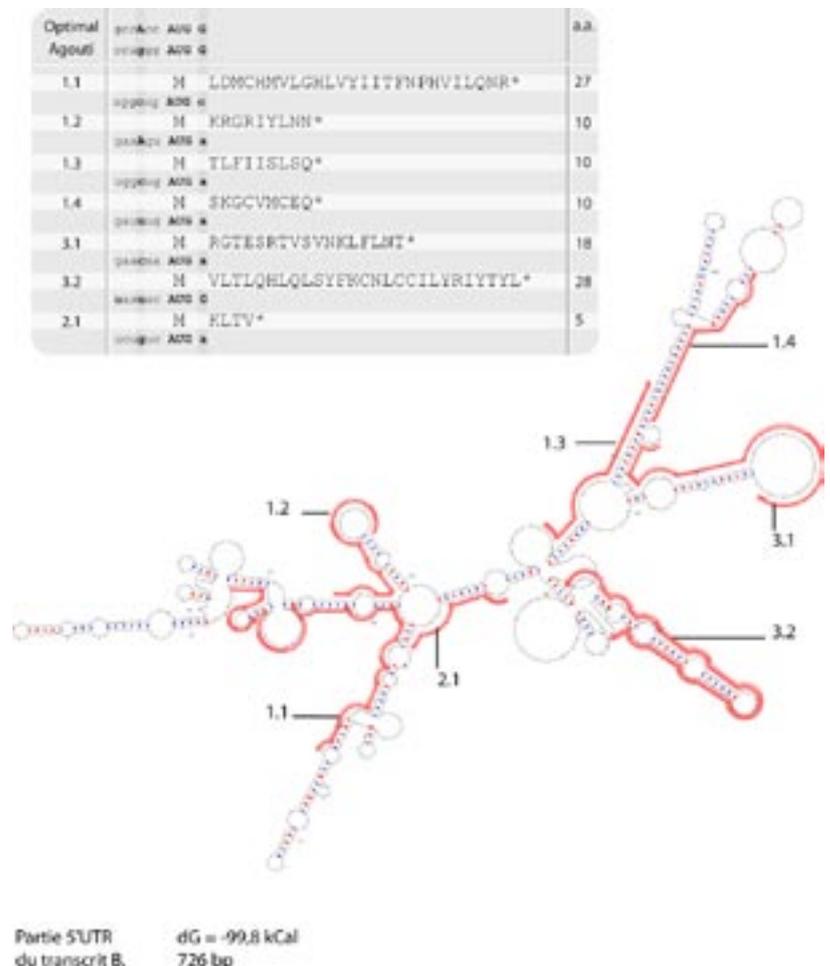


Figure 11: Structure secondaire putative de la région 5'UTR du transcrit A (414 pb). Les uORF identifiés sont surlignés en rouge dans la séquence. Le tableau contient les séquences peptidiques des uORF et leur séquence de Kozac entourant le codon d'initiation.

Figure 12: Structure secondaire putative de la région 5'UTR du transcrit B (714 pb). Les uORF identifiés sont surlignés en rouge dans la séquence. Le tableau contient les séquences peptidiques des uORF et leur séquence de Kozac entourant le codon d'initiation.



Les transcrits de types A et B ont des régions 5'UTRs qui font 414 et 714 pb respectivement. Grâce au programme m-fold (ZUKER 2003) les structures secondaires de ces régions 5'UTRs, relativement longues par rapport à la partie codante, ont été prédites. Les régions 5'UTRs ont des structures putatives très stables avec un $\Delta G = -90$ kcal et -99 Kcal, pour les types A et B respectivement (Figure 11 et 12). De plus 4 et 7 uORFs (upstream Open Reading Frame) ont été identifiés dans les régions 5'UTRs des transcrits A et B respectivement (Figures 11 et 12). Les séquences de Kozac qui englobent les codons d'initiations de ces uORFs ne sont pas plus favorables que pour le codon d'initiation d'Agouti. Ce qui permet de penser que la traduction de ces uORFs n'est pas favorisée par rapport à l'ORF d'Agouti. La traduction des ARNm eucaryotes peut se produire selon deux mécanismes connus. Le mécanisme de scanning implique la reconnaissance de l'extrémité 5' de l'ARNm et de sa coiffe m⁷G, suivie de la fixation du complexe initiateur (eIF2-GTP-tRNA^{Met}) / petite sous unité (40S) du ribosome. Ensuite il y a déplacement en 3' de ce complexe initiateur jusqu'à l'AUG d'initiation de la traduction (VAGNER *et al.* 2001). Plusieurs observations rendent ce mécanisme de traduction improbable pour les transcrit *Agouti* de type A et B : de longues séquences 5'UTR, des structures secondaires stables (> 50 kcal) et des codons d'initiation potentiels en amont de l'AUG d'*Agouti*. Ces caractéristiques sont compatibles avec un mécanisme d'initiation de la traduction alternatif qui est dépendant d'éléments en *cis* de l'ARNm, connus sous le nom d'IRES (Internal Ribosome Entry Site) (HELLEN and SARNOW 2001). Ce mécanisme a été décrit pour la première fois pour les ARNs viraux de cellules infectées, qui sont traduits lorsque le mécanisme d'initiation dépendant de la coiffe m⁷G est sous régulé (PELLETIER and SONENBERG 1988). Depuis, des IRES dans de nombreux ARNm cellulaires ont été découverts (VAGNER *et al.* 2001) et sont souvent nécessaires à la synthèse de protéines clés dans la survie de la cellule lors de stress. Le transport des acides aminés essentiels arginine et lysine, par exemple, est indispensable à la survie des cellules de mammifères. La réponse adaptative à ce stress nutritionnel implique une augmentation de la traduction de l'ARNm *cat-1*, codant le transporteur arginine/lysine, grâce à un site IRES. Les travaux de Yaman et ses collaborateurs ont démontrés que la traduction d'un uORF était nécessaire au changement de conformation qui déstabilise une structure secondaire inhibitrice et stabilise un IRES responsable de la traduction de *cat-1* (YAMAN *et al.* 2003). Un mécanisme de régulation de l'initiation de la traduction similaire peut être supposé pour les transcrits de types A et B d'*Agouti*. En effet, ces deux régions 5'UTR ont en commun l'exon 3A qui se retrouve en

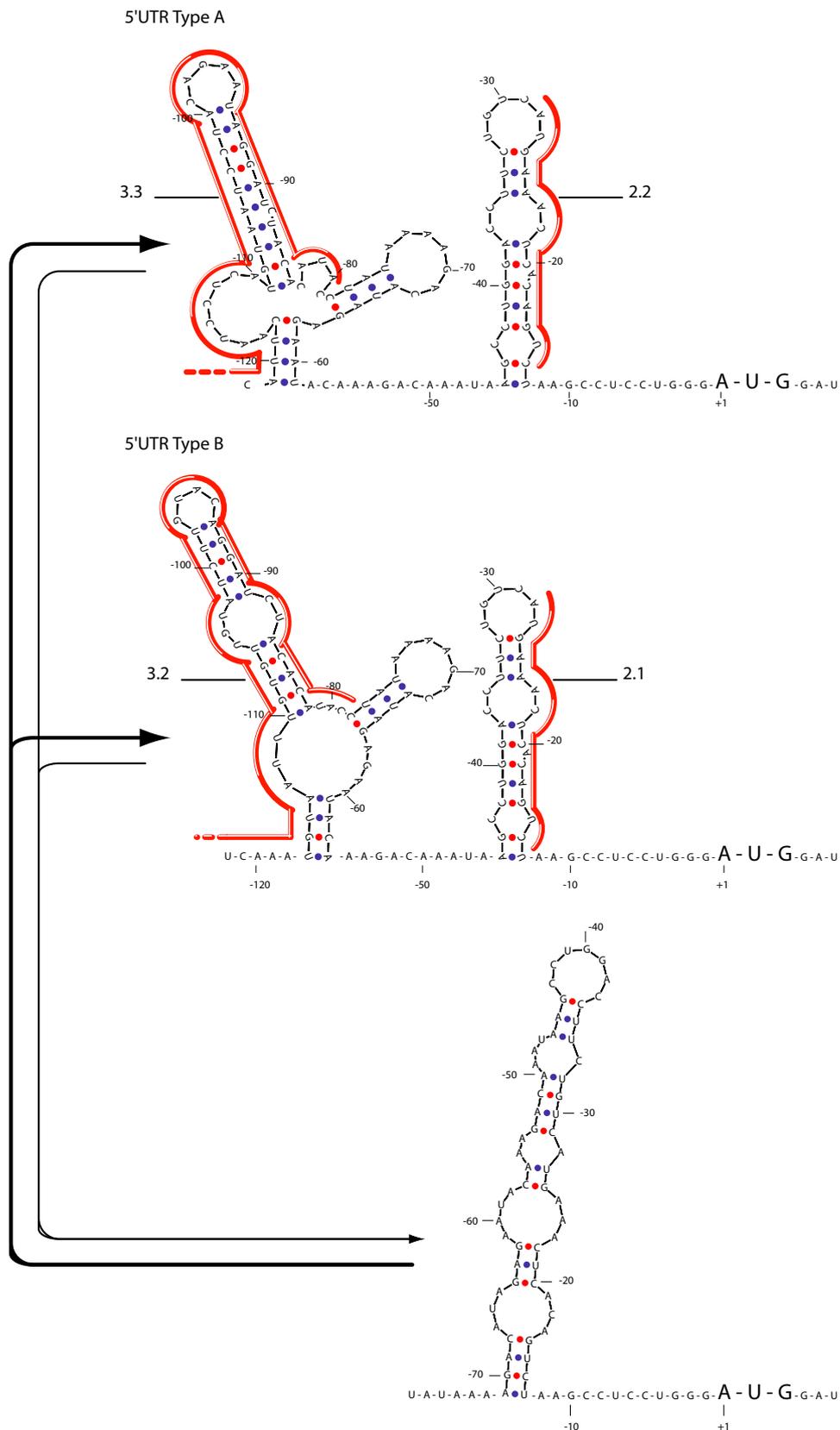


Figure 13: Hypothèses sur les modifications des structures secondaires en amont du codon d'initiation de l'ORF d'Agouti dans les transcrits de type A et B. Soit la traduction des uORFs (3.3 pour le type A, ou 3.2 pour le type B) déstabilise les structures secondaires des transcrits et ils adoptent alors une structure moins stable de type épingle à cheveux nécessaire à l'initiation de la traduction d'Agouti. Soit ces structures secondaires locales constituent des IRES nécessaires à l'initiation de la traduction d'Agouti.

position -94 à -10 par rapport au codon d'initiation d'Agouti (Figure 13). Cette séquence, ainsi que les séquences en amont dans les parties 5'UTR des deux transcrits, forment des structures secondaires stables. La traduction des uORFs 3.3 et 3.2 des 5'UTR A et B pourrait permettre de déstabiliser les structures secondaires de ces séquences et permettre la formation d'une structure en épingle de la séquence -70 à -10 nt. Cette épingle expose une boucle $_{-37}\text{CCUGGAC}_{-43}$ qui pourrait être une cible pour les facteurs non conventionnel d'initiation de la traduction appelés ITAFs (IRES *Trans* Acting Factors) (VAGNER *et al.* 2001). En absence de la traduction des uORFs, une autre hypothèse serait que les structures à trois épingles constitueraient le motif structurel des IRES comme ceux observés dans les isoformes A et C du gène FGF-1 (MARTINEAU *et al.* 2004). Les données actuelles, concernant les IRES découverts, démontrent que les structures tridimensionnelles des ARNm, plutôt que leurs séquences, sont déterminantes. Pour être opérationnel en tant qu'IRES un ARNm doit avoir une structure tertiaire qui permette d'interagir avec des co-facteurs protéiques, tels que les ITAF, et la petite sous unité 40S du ribosome. Dans le but de tester ces hypothèses, il conviendrait de déterminer si la protéine Agouti est traduite à partir de ces transcrits. Puis, déterminer l'importance des uORFs par mutagenèse. Et enfin, tester les capacités d'IRES de ces 5'UTRs grâce à une construction bi-cistronique (VAGNER *et al.* 2001). L'étude de la régulation traductionnelle de ces transcrits *Agouti* pourrait être d'un grand intérêt si des polymorphismes entre différentes races bovines venaient à être observés. En effet, un polymorphisme détecté dans la région 5'UTR du gène Connexin-32, diminuant l'activité IRES, est à l'origine de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, un syndrome neurodégénératif (HUDDER and WERNER 2000). Etant donné la grande conservation des exons A (1, 2, 3) et 1B chez l'homme (Figure 3, publication), des polymorphismes dans ces régions pourraient être liés à certaines formes d'obésité.

Une partie de la structure des régions promotrices est décrite dans cet article. Ces séquences régulatrices sont très conservées chez le porc et l'homme. Cela suggère que ces gènes pourraient s'exprimer de la même manière et produire les mêmes types de transcrits que chez le bovin.

En conclusion, le gène *Agouti* bovin est très conservé parmi les races bovine étudiées, il a une structure génomique complexe avec au moins trois promoteurs alternatifs qui dirigent l'expression de trois transcrits, qui possèdent la même partie codante et des extrémités 5' et 3' UTRs différentes. Donc s'il existe des différences génétiques entre les races bovines au niveau du gène *Agouti*, elles sont probablement localisées dans les régions régulatrices (promotrices,

introniques ou les régions des transcrits non traduites). De plus, la grande conservation, entre le Bovin, le Porc et l'Homme, des régions régulatrices identifiées suggère que le gène *Agouti* est régulé de la même manière et pourrait avoir les mêmes fonctions physiologiques, en plus de son rôle dans la pigmentation, chez ces trois espèces.

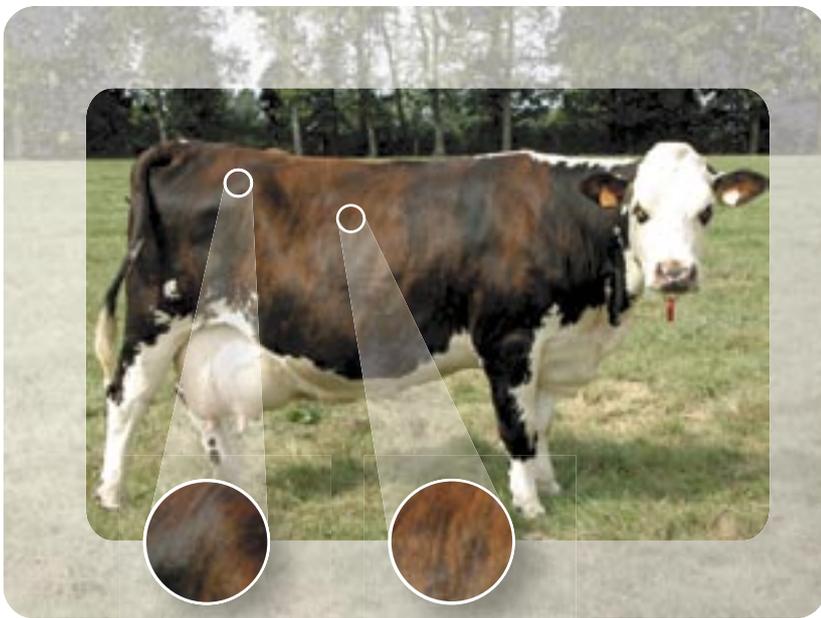
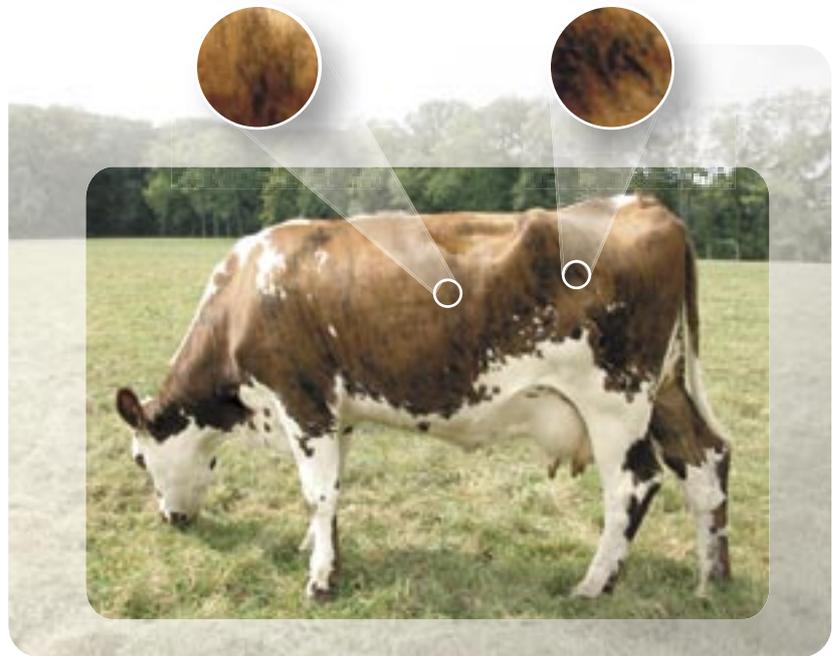


Figure 14: La bringeure chez deux animaux de race Normande.

La bringeure est produite par un nouvel allèle

Agouti (A^{br})

Introduction

Parmi les races bovines porteuses de l'allèle sauvage *Extension* (E^+), permettant d'observer les effets de la protéine Agouti sur la coloration, la Normande a un patron de coloration caractéristique, appelé bringeure. Ce patron est défini par la présence variable de poils noirs sur un fond rouge/brun. Lorsque la bringeure est abondante, les poils noirs sont rassemblés en raies noires sur un fond rouge (Figure 14). Par ailleurs, la bringeure n'a pas toujours ce type d'organisation plus ou moins régulière, mais peut aussi avoir un aspect complètement aléatoire avec un amas, plus ou moins concentré, de taches noires au milieu d'un fond rouge/brun (Figure 14). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette déposition plus ou moins aléatoire d'eumélanine dans les poils du manteau des individus de race Normande. Premièrement, la bringeure peut être le résultat de l'action d'un locus *Bringé* (*Brindle*) (OLSON 1999), non identifié. Deuxièmement, un allèle spécifique du gène *Extension* pourrait être responsable de la déposition plus ou moins importante de pheomélanine, de type e/e , ou d'eumélanine, de type E^D/E^D . Cependant, cette hypothèse n'est pas compatible, d'une part, avec le génotype sauvage (E^+/E^+) au locus *Extension* des individus de race Normande, et d'autre part, avec les résultats, décrits par Schmutz et ses collaborateurs, qui ont démontrés que le récepteur Mc1r n'était pas responsable du phénotype bringé chez le chien (SCHMUTZ *et al.* 2003). Troisièmement, au laboratoire, nous avons démontré que le niveau d'expression du gène *Tyrp1* influence la quantité d'eumélanine, observée dans le manteau de différentes races bovines ((GUIBERT *et al.* 2004), voir annexe : « Pheomelanin coat colour dilution in french cattle breeds is not correlated with the *TYR*, *TYRP1* and *DCT* transcription levels »). Donc, une expression variable du gène *Tyrp1* pourrait produire le phénotype bringé observé. Quatrièmement, les souris au pelage mosaïque ressemblent au phénotype bringé observé chez la Normande. Ces souris mosaïques sont porteuses de l'allèle A^{vy} , qui correspond à l'insertion d'un rétrotransposon murin, IAP, inséré en amont du gène *Agouti* (MORGAN *et al.* 1999; PERRY *et al.* 1994). L'expression

variable de cet élément provoque l'expression hétérogène du gène *Agouti* dans le pelage de l'animal. Par conséquent, le gène *Agouti* bovin pourrait jouer un rôle dans la bringeure de la Normande.

Dans le but d'identifier le(s) gène(s) responsable(s) de la bringeure chez la Normande, nous avons étudié les niveaux d'expression de différents gènes de coloration dans la peau d'individus de race Normande et de descendants de deuxième génération de croisements Prim'Holstein X Normande. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article qui suit (soumis pour publication dans le journal Genetics).

Résultats et discussion

Les résultats présentés dans cet article mettent en évidence le rôle d'Agouti dans la pigmentation chez la race Normande. Nous avons observé une corrélation inverse entre le niveau d'expression d'Agouti et le niveau d'expression de *Tyrp1* dans la peau de trois individus Normand. De plus, les mesures des niveaux d'expression d'Agouti et des gènes de la famille *Tyr*, chez les individus de deuxième génération de croisements Prim'Holstein X Normande, ont mis en évidence une proportionnalité inverse entre les niveaux des transcrits *Agouti* et *Tyrp1*. *Agouti* influence donc directement le niveau d'expression de *Tyrp1*, alors que les gènes *Tyr* et *Dct* nécessitent probablement des facteurs régulateurs supplémentaires, puisque l'on n'observe pas cette proportionnalité inverse. Le rapport de proportionnalité, entre *Agouti* et *Tyrp1*, est représenté par une droite sur laquelle s'alignent les points, correspondant aux niveaux d'Agouti en fonction des niveaux de *Tyrp1*, dans les échantillons de peau colorés des animaux 123 et 26 (Figure 2, publication). En ce qui concerne les animaux 1260 et 234, leurs niveaux d'Agouti en fonction de *Tyrp1* ne s'alignent pas avec les points des individus 123 et 26. Par conséquent, il doit exister des facteurs modificateurs de l'action d'Agouti sur *Tyrp1* qui pourraient expliquer cette différence entre les animaux 123 et 26 et les animaux 1260 et 234. Parmi les gènes nécessaires à l'action d'Agouti, le gène *Extension* codant le récepteur Mc1r pourrait s'exprimer plus fortement dans la peau des individus 1260 et 234. Ces individus (234, 26, 1260, 123), de deuxième génération de croisements Prim'Holstein X Normande, sont tous porteurs de l'allèle sauvage d'*Extension* à l'état homozygote (E^+/E^+) provenant de la race Normande. Donc les différences putatives, de niveau d'expression de Mc1r, ne seraient pas dues à un nouvel allèle *Extension*. Par contre, des niveaux physiologiques élevés d' α -MSH pourraient stimuler l'expression du Mc1r (ROUZAUD *et al.* 2003). Les individus sur-exprimant le Mc1r auraient une robe plus sombre en présence de la même quantité d'Agouti (Figure 15 A). Par ailleurs, l'*Attractine* et *Mahoganoïd* sont deux gènes suppresseurs de l'action d'Agouti sur le Mc1r. La mutation de l'un de ces gènes empêche le développement de l'obésité et d'un pelage jaune chez les souris porteuses de l'allèle A^y (MILLER *et al.* 1997). L'*Attractine* est un co-récepteur de faible affinité pour Agouti (HE *et al.* 2001), et *Mahoganoïd* appartient à la même voie de régulation que l'*Attractine* (HE *et al.* 2003). Une sur-expression de l'*Attractine* et/ou *Mahoganoïd* pourrait augmenter l'effet d'Agouti chez les individus 1260 et 234 (Figure 15 D). Inversement, un faible niveau d'expression d'*Attractine* et/ou *Mahoganoïd*, chez les individus 123 et 26, diminuerait l'effet d'Agouti sur la pigmentation (Figure 15 C), et expliquerait le

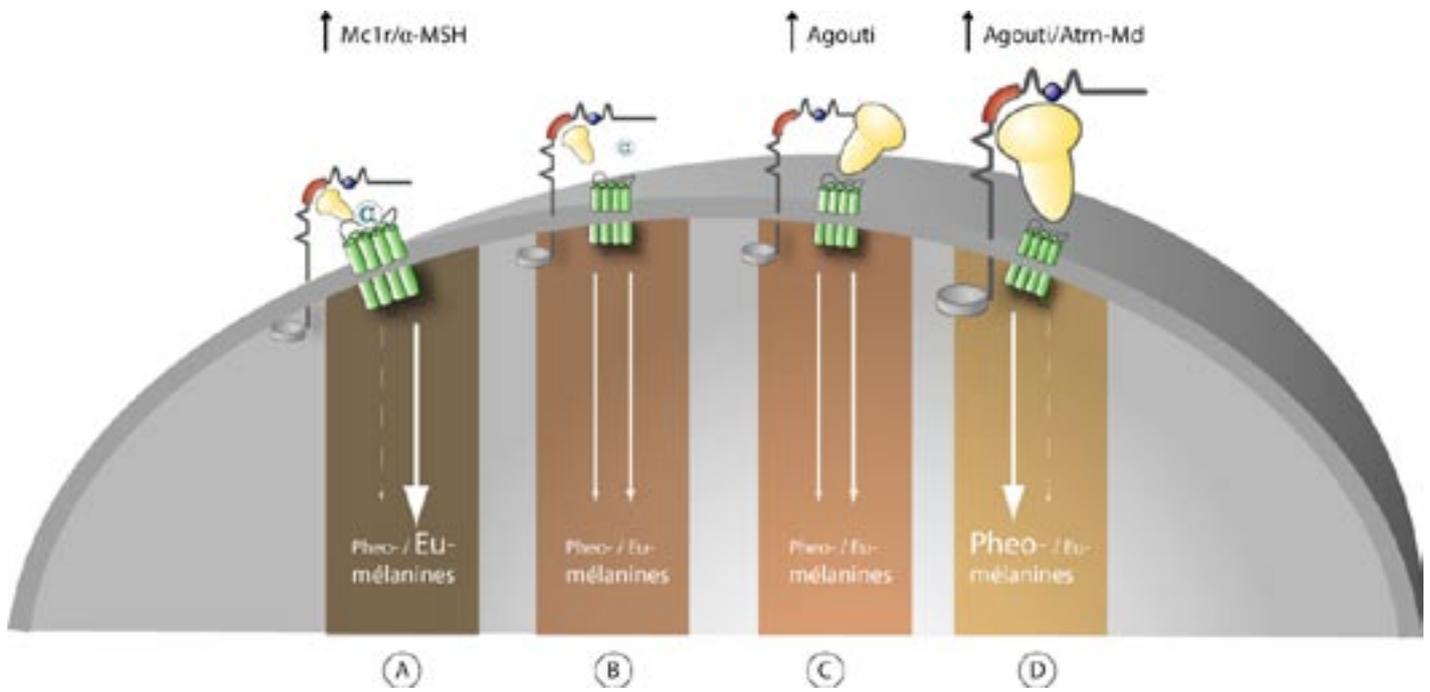


Figure 15: Modes de co-régulation probables par différents co-acteurs connus de l'action d'Agouti sur la pigmentation. Le Mc1r est représenté en vert, Agouti en jaune, l'Attractine et Mahoganoïd sont représentés par les structures coudé et en forme d'assiette, respectivement.

paradoxe qu'il y a entre le fort niveau d'expression d'*Agouti*, chez l'animal 123 à robe rouge, et le plus faible niveau d'*Agouti*, chez l'animal 1260 qui a une robe plus claire. La mesure des niveaux d'expression des gènes *Extension*, *Attractine* et *Mahoganoïd* permettrait de choisir parmi ces différentes hypothèses.

Dans cet article, nous avons isolé une mutation du gène *Agouti* bovin responsable de la sur-expression d'un transcrite alternatif. Cet allèle, que nous avons appelé A^{br} , est comparable aux allèles A^{vy} et A^{hvy} , isolés chez la souris. Bien qu'on ne puisse comparer les niveaux de sur-expression provoqués par les éléments IAP insérés dans les allèles murin, et les niveaux provoqués par l'élément BT_LINE inséré dans l'allèle bovin, on observe le même type d'expression en mosaïque. Les souris au pelage mosaïque ou jaune développent le syndrome d'obésité. Bien que la Normande développe un pelage mosaïque (bringeure), on n'observe jamais d'individus à robe jaune ou obèses. Ces observations conduisent à penser, soit que les bovins ne peuvent pas produire de phéomélanine jaune et ne peuvent devenir obèses en raison de leur statut de ruminant, soit qu'il existe des facteurs limitants de l'action d'*Agouti* chez le bovin. Cette deuxième possibilité suggère la même hypothèse que précédemment, qui est que l'*Attractine* et/ou *Mahoganoïd* seraient impliqués dans la définition du patron de coloration et la modulation des effets d'*Agouti*. Chez la souris, l'*Attractine* (*Mahogany*) est exprimé dans le cerveau, le cœur, les reins, le foie, les poumons et les mélanocytes (GUNN *et al.* 1999). La forte expression dans l'hypothalamus permettrait l'effet inhibiteur important d'*Agouti* sur le Mc4r et l'obésité par hyperphagie chez les souris A^y . Si l'*Attractine* n'est pas aussi fortement exprimée dans l'hypothalamus chez le bovin, l'allèle A^{br} ne pourrait pas avoir les mêmes effets que A^y . Par ailleurs, la Normande est la plus importante productrice de matières grasses dans le lait, par rapport aux autres races laitières (Prim'Holstein). Si l'allèle A^{br} est impliqué dans ce phénomène, il serait intéressant de déterminer les niveaux d'expression des gènes *Attractine* et *Mahoganoïd* dans la glande mammaire.

L'élément LINE inséré dans l'allèle A^{br} possède toutes les caractéristiques d'un élément transposable fonctionnel. Le nombre d'éléments LINE est estimé à environ 100.000 dans le génome humain, mais seulement 30 à 60 éléments seraient capables de rétrotransposition (SASSAMAN *et al.* 1997). En effet, près de 95% des LINE humains sont tronqués en 5' ou bien mutés, ce qui abolit leur activité. Actuellement, sur les 12 L1 humains responsables de mutations à l'origine de maladies génétiques, seulement 2 sont entiers et fonctionnels pour la rétrotransposition (KIMBERLAND *et al.* 1999). L'élément LINE bovin isolé sera d'une grande

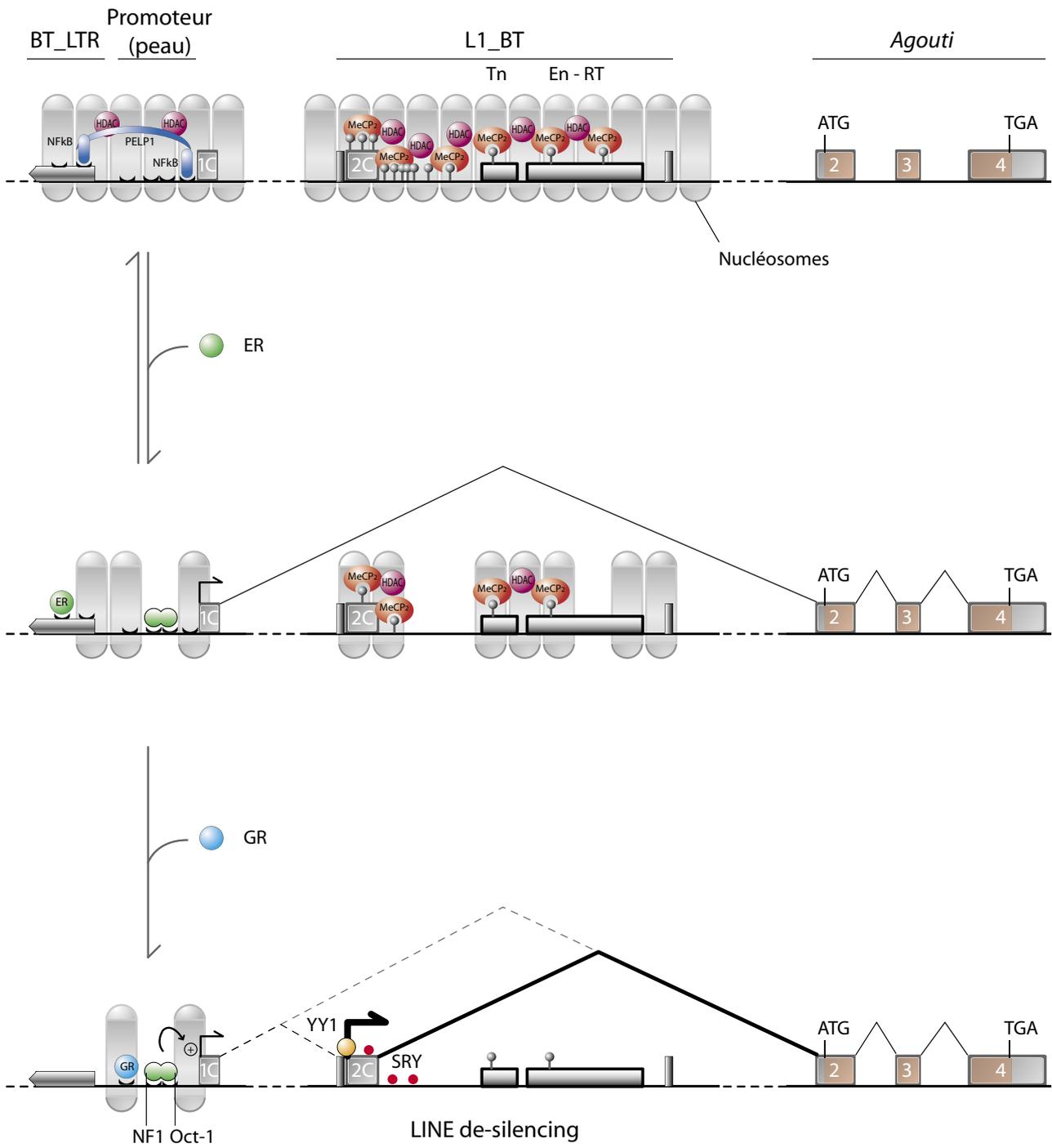


Figure 16: Hypothèse sur le de-silencing du LINE de l'allèle A^{br} .

utilité pour étudier, d'une part le mécanisme de rétrotransposition grâce aux ORFs codant une Transposase et une Endonucléase-Reverse Transcriptase, et d'autre part les facteurs essentiels à l'activité promotrice de l'élément, hormis les facteurs YY1 et SRY déjà connus (ATHANIKAR *et al.* 2004; TCHENIO *et al.* 2000). Notamment, l'étude par transfection transitoire d'une construction contenant le promoteur L1-BT en amont d'un gène rapporteur, et de différentes délétions et mutations de ce promoteur, permettrait de comprendre les mécanismes d'activation transcriptionnelle.

Grâce à une approche de digestion par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation, suivit d'hybridation par Southern blot, nous avons démontré que le statut de méthylation de cet élément LINE est corrélé à l'activité transcriptionnelle de l'allèle *A^{br}*. La méthylation de sites CpG spécifiques dans le promoteur LINE est responsable de la répression transcriptionnelle (HATA and SAKAKI 1997). Les sites CpG méthylés sont reconnus par MeCP2 (Methyl-CpG-binding Protein 2) qui, associée à Sin3 et HDAC (Histone Deacetylase) (JONES *et al.* 1998; NAN *et al.* 1998), forme un complexe répresseur de la transcription par désacétylation des histones et induction de l'état inactif de la chromatine (Figure 16). Ce mécanisme de répression transcriptionnelle des éléments LINEs, par la méthylation de la région 5' promotrice interne, est considéré comme le mécanisme majeur d'inactivation des rétrotransposons dans les cellules somatiques et germinales. La méthylation hétérogène, ou mosaïque, de l'élément LINE *A^{br}* dans la peau des individus de race Normande est probablement à l'origine de l'expression mosaïque d'*Agouti* et donc du phénotype bringé. La déméthylation stochastique du LINE au cours des divisions cellulaires est un mécanisme probable d'apparition de la bringeure. En effet, Barbot et ses collaborateurs ont démontré que l'activité transcriptionnelle circadienne du gène *m.nocturnin* est responsable de la déméthylation progressive d'un élément IAP, inséré dans un intron du gène (BARBOT *et al.* 2002). Ce mécanisme de « de-silencing », par perte stochastique des marques épigénétiques des rétrotransposons, pourrait être un processus naturel associé au vieillissement. L'induction répétée, à l'origine de la déméthylation du LINE *A^{br}*, pourrait provenir de l'activité transcriptionnelle du promoteur spécifique de la peau. En effet, le promoteur 1C, à l'origine de l'expression du transcrit spécifique de la peau, est très conservé par rapport au promoteur de peau du gène *Agouti* murin. Chez la souris, le gène *Agouti* s'exprime entre le quatrième et sixième jour de la croissance du poil (VRIELING *et al.* 1994). Cette activité cyclique pourrait être à l'origine de l'induction répétée du LINE. Cependant, le promoteur 1C bovin contient, à la différence du promoteur murin, une séquence BT-LTR antisens a -264 pb en

amont du site d'initiation de la transcription. Il se pourrait que le promoteur 1C bovin n'ait pas l'activité cyclique du promoteur murin, d'autant plus que la bande sub-apicale jaune n'est jamais observée chez le bovin. Il est donc nécessaire d'étudier l'activité et les sites de facteurs de transcription nécessaires au promoteur 1C. Des sites putatifs pour la fixation de facteurs de transcription ont été identifiés dans cette séquence promotrice 1C, tels qu'un site répondant aux glucocorticoïdes (GRE : Glucocorticoid Responsible Element) et quatre aux oestrogènes (ERE : Estradiol Responsible Element), ainsi que trois sites NF-1 (Nuclear Factor 1), six Oct-1 (Octamer-binding factor 1) et cinq NFκB (Nuclear Factor kappa B). Récemment, le facteur PELP1 (proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein 1) a été identifié comme une protéine, à la fois co-activatrice en présence d'ER (Estrogen Receptor), en recrutant les HATs (Histones Acetyl-Transferase), et à la fois co-répresseur en présence d'autres facteurs de transcription tels que GR, Nur77, AP1, NFκB et SRF (CHOI *et al.* 2004). Le mécanisme de régulation putatif du promoteur 1C est représenté dans la figure 16. En présence des facteurs NFκB et GR, il y a un recrutement des HDAC par l'intermédiaire de PELP1 conduisant à la répression de la transcription par déacétylation de la chromatine (CHOI *et al.* 2004). En revanche, en présence de ER, PELP1 recrute les HATs qui hyperacétylent la chromatine et active la transcription. L'activité du promoteur 1C pourrait donc varier en fonction de la concentration en oestrogènes. Par ailleurs, un modèle à deux étapes décrivant l'activation transcriptionnelle du promoteur (LTR) MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) a été décrit. Ce modèle postule que les nucléosomes sur le LTR sont constitutivement positionnés, empêchant la fixation des facteurs NF-1 et Oct-1. La première étape correspond à l'induction, par GR, d'une chromatine ouverte. La deuxième étape correspond à l'activation transcriptionnelle par les facteurs NF-1 et Oct-1 (BEATO 1996; HAGER 2001) (Figure 16). Ce promoteur 1C pourrait, non seulement, être étudié par transfection transitoire, mais aussi conjointement avec l'élément LINE grâce au système mis au point par Schübeler et ses collaborateurs (SCHUBELER *et al.* 2000). Ce système permet d'étudier les effets de la méthylation sur la transcription, la structure de la chromatine, l'acétylation des histones et du temps de réplication, en insérant spécifiquement des constructions méthylés et non méthylés dans des régions génomiques connues. Cette méthode permettrait d'étudier le mécanisme de « de-silencing » de l'élément LINE en fonction de l'activité transcriptionnelle du promoteur de la peau.

Détection de la protéine Agouti dans la peau.

L'étude de la protéine Agouti au niveau traductionnel et post-traductionnel s'avère beaucoup plus délicate que les études génomiques et transcriptionnelles. En effet, la production d'une protéine recombinante est difficile en raison de la structure et de la composition en acides aminés de cette petite protéine. C'est pourquoi elle a été, soit produite dans des cellules d'insectes (*Trichoplusia ni.*) infectées par le baculovirus, exprimant la protéine recombinante (LU *et al.* 1994; OLLMANN and BARSH 1999; OLLMANN *et al.* 1998; WILLARD *et al.* 1995), soit par synthèse de peptides à partir de la séquence protéique Agouti murine (MATSUNAGA *et al.* 2000), pour pouvoir produire des anticorps dirigés contre Agouti. La taille de la protéine Agouti, purifiée à partir du surnageant de culture des cellules d'insectes a une masse moléculaire d'environ 18 kDa (LU *et al.* 1994; OLLMANN *et al.* 1998) sans les 22 acides aminés correspondant au peptide signal. La différence de taille observée par rapport à la taille prédite de la protéine sans le peptide signal correspondrait à la glycosylation de la protéine (OLLMANN *et al.* 1998). Par ailleurs, des formes monomériques et dimériques de la protéine ont été identifiées (WILLARD *et al.* 1995). Les anticorps polyclonaux, dirigés contre la protéine purifiée, révèlent une bande d'environ 21 kDa dans des extraits protéiques de peau, après migration en condition non réductrices (OLLMANN and BARSH 1999). L'anticorps anti-Agouti produit grâce à un peptide synthétique, correspondant aux 15 derniers acides aminés en C-terminal de la protéine murine, a permis d'identifier une bande d'environ 16 kDa sur des extraits protéiques de peau de souris *A/a* (MATSUNAGA *et al.* 2000), après séparation SDS-PAGE en conditions réductrices.

Au laboratoire, les tentatives de production de la protéine Agouti bovine que nous avons effectuées dans les systèmes d'expression de protéines recombinantes *E.coli*, RTS-500 (production *in-vitro* grâce à des extraits acellulaires d'*E.coli*) et dans la levure *Pischia pastoris*, ont toutes échouées en raison, soit de la présence de codons rares successifs équivalents à un codon stop chez *E.coli*, soit d'une insolubilité de la protéine Agouti chez la levure. Bien que le système de production par baculovirus présente l'avantage de produire une protéine glycosylée (WILLARD *et al.* 1995), les étapes de purifications nécessaires et l'accessibilité de ce système peu répandu, nous ont fait préférer la production d'anticorps dirigés contre des peptides synthétiques.

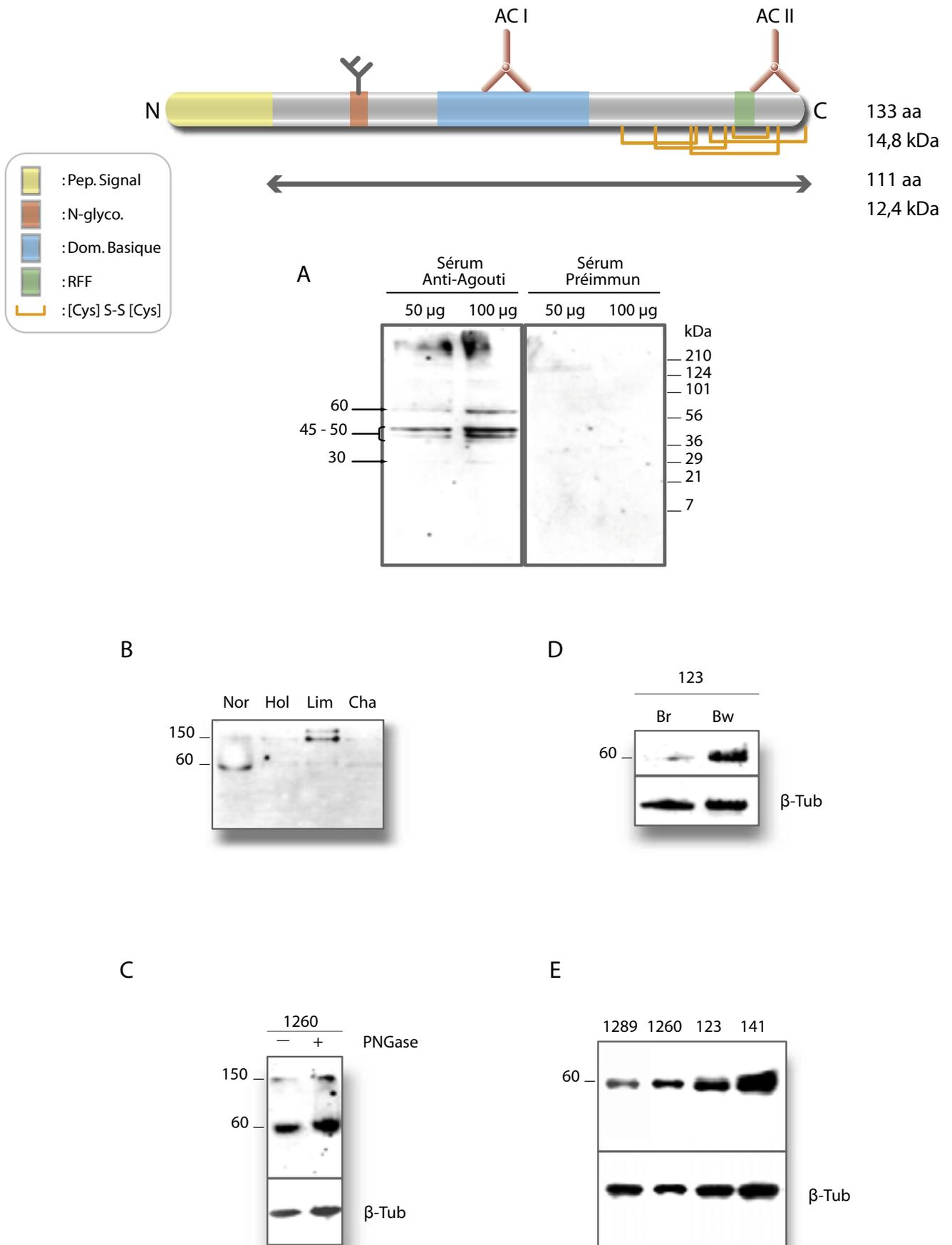


Figure 17: Détection de la protéine Agouti bovine par Western blots. La structure et les domaines de la protéine Agouti bovine reconnus par les deux anticorps sont représentés en haut. Nor: Normande; Hol: Prim'Holstein; Lim: Limousine; Cha: Charolaise; 123, 1260, 1289, 141 : Individus de deuxième génération de croisement Holstein X Normande; Br: bringé; Bw: marron; β-Tub: beta-Tubuline (contrôle).

Résultats et discussion

Deux peptides synthétiques, correspondant à une partie du domaine basique et à l'extrémité C-terminale de la protéine, ont été injectés à deux lapins (Figure 17). Les sérums des deux lapins ont été testés sur des extraits de peau de race Normande (Figure 17 A). Les western blots révèlent des bandes de 30, 45, 50 et 60 kDa environ qui n'apparaissent pas avec les sérums pré-immuns. La taille théorique de la protéine Agouti dépourvu de son peptide signal est 12.4 kDa. La taille de la protéine Agouti murine sans son peptide signal et glycosylée est environ 16 kDa (MATSUNAGA *et al.* 2000). Les bandes à 30 kDa, 45-50 kDa et 60 kDa pourraient correspondre à un dimère de la protéine mature et glycosylée, un trimère de protéines matures ayant un niveau de glycosylation variable, et un tétramère, respectivement. La multimérisation de la protéine Agouti a déjà été observée *in-vitro* par certains auteurs (WILLARD *et al.* 1995). Malgré des conditions de dénaturation élevée (β -mercaptoethanol et 15 min à 100°C), nous n'avons jamais observé de forme monomérique de la protéine Agouti bovine (Figure 17 A). Contrairement à ce qui a été observé chez la souris, la protéine Agouti bovine existerait sous forme tétramérique dans la peau.

Ensuite, les sérums finaux des deux lapins ont été purifiés par chromatographie d'affinité avec les peptides basique et C-terminal (Figure 17). Les anticorps purifiés, dirigés soit contre le domaine basique de la protéine, soit contre son domaine C-terminal, ont été testés sur des extraits protéique de peau de races Normande, Prim'Holstein, Limousine et Charolaise (Figure 17 B). Les deux anticorps reconnaissent la bande de 60 kDa dans la peau des quatre races bovine. Une bande de plus grande intensité est observée chez la Normande, conformément à ce que l'on attendait. Par ailleurs, une bande d'environ 150 kDa apparaît chez les quatre races, et elle est plus intense chez la Limousine avec une deuxième bande d'environ 200 kDa. De même, cette bande supplémentaire apparaît dans les extraits protéique des individus de deuxième génération de croisements Prim'Holstein X Normande (résultat non montré). Cette bande de grande taille pourrait correspondre la protéine Agouti liée covalamment à une autre protéine de grande taille. L'attractine est connue pour interagir avec la protéine Agouti (HE *et al.* 2001). La protéine attractine humaine existe sous deux formes : une forme transmembranaire de 175 kDa et une forme sécrétée de 134 kDa (DUKE-COHAN *et al.* 1998). La forme sécrétée est produite à partir d'un transcrit alternatif du gène *Attractine* de 4 kb, apparu en raison de l'utilisation d'un site de polyadénylation d'un élément LINE, inséré dans un intron du gène (GUNN *et al.* 1999). La protéine liée à Agouti chez le bovin pourrait être une forme sécrétée de la protéine Attractine.

Puisque les N-glycannes sont connus pour interagir avec certains domaines protéiques de l'Attractine (le domaine de type lectine, par exemple), nous avons déglycosylé les échantillons protéiques avant leur réduction/dénaturation (Figure 17 C). Pour qu'une liaison covalente, tel qu'un pont di-sulfure inter protéines, se forme, il faut que ces deux protéines interagissent. Ainsi, si ces deux protéines ne sont plus en contact après la déglycosylation, on ne devrait plus observer cette bande à 150 kDa. Le résultat de la Figure 17C montre que la liaison covalente d'agouti avec cette protéine inconnue n'a pas été créée lors du traitement des échantillons, mais qu'elle doit exister naturellement dans la peau. En effet, l'Attractine contient des domaines de type EGF-like (Epidermal Growth Factor) connus pour former des ponts di-sulfure inter-domaines (SAKAI *et al.* 1991). Une autre interprétation de ce résultat serait qu'Agouti n'a pas été déglycosylé, soit parce que les conditions de la réaction ne sont pas adéquates, soit parce que le N-glycane d'Agouti n'est pas accessible à la PNGase s'il est en interaction avec une autre protéine.

Les anticorps purifiés ont ensuite été utilisés pour détecter les quantités relatives de protéine Agouti, d'une part, dans des échantillons de peau d'un même animal, et d'autre part, dans des échantillons de peau de différents animaux dont les niveaux d'expression du gène *Agouti* sont connus (Figure 2, article « Brindle cattle coat color »). Les niveaux observés par Western blot sont corrélés aux niveaux de transcrits et à la coloration dans les échantillons de peau de l'animal 123 (Figure 17 D). De plus, l'expression de la protéine est exprimée de manière croissante entre les individus 1289, 1260, 123 et 141 (Figure 17 E). Ceci confirme que l'allèle A^{br} est responsable de la sur-expression d'*Agouti*, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel.

Conclusions et perspectives

L'énorme diversité des patrons de coloration est probablement la manifestation la plus remarquable des relations complexes entre les facteurs environnementaux, les voies de transduction du signal, et les facteurs de transcription participant à la genèse et à la différenciation d'une lignée cellulaire. En effet, les mélanocytes sont indispensables pour la viabilité. Les conséquences visibles des mutations affectant la lignée mélanocytaire ont permis d'estimer à plus de 100, le nombre de gènes indépendants impliqués dans la définition de la coloration chez la souris. Près d'un tiers de ces gènes ont été clonés et ne codent pas seulement des protéines nécessaires à la synthèse des mélanines et la fonction du mélanosome, mais codent aussi des molécules de signalisation et des facteurs de transcription jouant un rôle critique dans le développement de la lignée mélanocytaire. L'analyse moléculaire des mutants murins a permis de déterminer la structure des gènes et la fonction de leurs produits. Mais au delà, elle constitue une véritable banque de données génétiques pour la compréhension des modifications qui sous-tendent les patrons de coloration d'autres espèces, telle que l'espèce bovine. La découverte de l'allèle *Agouti* bovin A^{br} , responsable de la bringeure chez la Normande, présenté dans cette thèse, en est un exemple.

La problématique posée lorsque j'ai commencé ce travail de thèse était la suivante : Le gène *Agouti* est-il impliqué dans la définition du patron de coloration d'une ou plusieurs races bovines françaises ?

La première démarche, choisie au laboratoire, consistait en la recherche de polymorphismes dans la partie codante du gène *Agouti* de différentes races bovines. Elle a révélée que la partie codante du gène *Agouti* est conservée chez toutes les races étudiées. La même étude avait été menée chez l'homme, et avait démontré la stricte conservation de la partie codante du gène dans les différentes populations étudiées. En revanche, un polymorphisme dans la partie 3'UTR du transcrit, pouvant correspondre à une altération des mécanismes de régulation traductionnelle, a été identifié (KANETSKY *et al.* 2002; VOISEY *et al.* 2001). Cela permettait de penser, qu'*Agouti* a un rôle physiologique supplémentaire et essentiel, à coté de son rôle putatif dans la pigmentation. De même, l'absence de mutations de la partie codante du gène chez les différentes races bovines que l'on a étudiées, permet de supposer une fonction physiologique supplémentaire à la coloration chez l'espèce bovine. Par la suite, nous nous sommes intéressés

aux parties régulatrices d'*Agouti*, qui contrairement à la région codante, sont très complexes. En effet, nous avons découvert que le gène dispose d'au moins trois promoteurs dirigeant l'expression de transcrits alternatifs ayant des régions régulatrices spécifiques. L'identification des parties 5'UTRs, de deux de ces transcrits, nous a révélé que l'expression de la protéine *Agouti*, dans les autres tissus que la peau, serait fortement régulée au niveau traductionnel, grâce à des structures secondaires et probablement à des facteurs régulateurs de la traduction. Ce niveau complexe de régulation n'est pas surprenant, si l'on considère les effets pléiotropes (obésité, diabète, croissance accrue, diminution de la fertilité, sensibilité aux tumeurs) associés à la sur-expression d'*Agouti* dans différents tissus, autres que la peau, chez la souris. De plus, conformément à ce que nous supposions, l'expression de transcrits *Agouti* dans le coeur, le foie, les poumons, les reins, le cerveau, les adipocytes et la peau est similaire au patron d'expression chez l'homme. Ceci est aussi confirmé par la conservation des régions régulatrices entre ces deux espèces. La poursuite de ce travail pourrait consister dans l'étude par mutagenèse des séquences 5'UTR identifiées et leur introduction dans une construction bi-cistronique. En effet, la découverte des 5'UTR *Agouti* humain (A. Van Daal, communication personnelle), et des mécanismes de régulation traductionnelle de ce gène, permettra d'avancer dans la compréhension des facteurs de sensibilité génétique liés à l'obésité humaine, qui est en passe de devenir l'un des facteurs majeur de morbidité des pays industrialisés.

La découverte d'une sur-expression d'*Agouti* dans la peau des animaux de race Normande, la mise à disposition d'échantillons d'individus de deuxième génération de croisements Prim'Holstein X Normande, effectués au domaine expérimental animal du Pin (INRA, le Pin-au-Hara, Normandie), nous a permis de prouver l'implication du gène *Agouti* dans la définition du patron de coloration bringé et d'isoler l'allèle (A^{br}) spécifique à cette race. Un test génétique pour la détection de cet allèle pourra être mis à la disposition des sélectionneurs et de tous les acteurs de la filière bovine Normande soucieux de la traçabilité des produits dérivés, tels que le lait et la viande, après le génotypage de plusieurs individus de différentes races. La mutation, propre à cet allèle A^{br} , a toutes les chances d'être unique à la race Normande, puisque qu'elle correspond à une insertion récente d'un élément transposable, dont la séquence n'a probablement pas beaucoup divergé par rapport à l'élément d'origine puisqu'elle conserve toutes les caractéristiques fonctionnelles de sa classe. Ce test génétique permettra aussi de déterminer s'il existe une association entre l'allèle A^{br} et la production de matières grasses dans le lait de Normande, en mettant, encore une fois, à profit les animaux croisés du domaine

expérimental animal du Pin. En effet, des mesures de production de matières grasses ont déjà été réalisées montrant de grandes différences entre certains individus. Si cette association existe, les vaches Normandes pures présentant le moins de bringeure dans leur robe, c'est à dire les plus claires, produiront un lait plus riche en matière grasse que les vaches sombres présentant une grande quantité de bringeure (poils noirs). Puisque la race Normande est connue pour son lait riche, autant en matière grasse qu'en matière protéique, et pour la saveur et le persillé de sa viande, qui font d'elle une race mixte, le test génétique, qui sera mis en place grâce aux résultats présentés ici, contribuera à maintenir ce double critère de qualité, apprécié aussi bien par les éleveurs que les consommateurs.

Certaines données nous font penser que d'autres loci sont impliqués dans la modulation de l'activité de la protéine Agouti. Ces loci sont à l'origine de certaines variations de coloration, indépendantes de A^{br} , observés chez les descendants F_2 de croisements Prim'Holstein X Normande. L'analyse biochimique de l'expression de la protéine Agouti suggère sa présence sous forme tétramérique libre et sous forme liée à une protéine de grande taille. L'hypothèse que l'on peut formuler est que cette protéine de grande taille pourrait correspondre à une forme sécrétée de la protéine Attractine. En effet, l'Attractine est un co-récepteur indispensable d'Agouti, qui existe sous forme transmembranaire et sous forme sécrétée chez l'homme. Les variations du rapport de la forme sécrétée et transmembranaire pourrait expliquer les différences d'effets sur la coloration de la protéine Agouti observées chez certains descendants F_2 . L'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Attractine* et l'immunoprécipitation de la protéine liée à Agouti permettront de déterminer l'implication de l'Attractine dans la définition de la coloration de la robe bovine.

Au delà de l'intérêt appliqué de l'identification de cet allèle A^{br} , l'isolement d'un élément LINE complet est une opportunité unique d'étudier les effets des rétrotransposons sur l'évolution des génomes. Depuis le séquençage complet du génome humain, le nombre d'éléments LINE a été estimé à 516.000 copies, soit près de 17% du génome. La grande majorité des LINE sont tronqués ou mutés et donc non fonctionnels. Le nombre d'éléments complets est estimé à environ 60. Bien que faible, ce nombre est suffisant pour provoquer un certain nombre de maladies génétiques humaines. Actuellement, seulement 2 LINE humains complets sont connus. La compréhension des facteurs inductifs de la rétrotransposition de ces éléments, ainsi que les mécanismes de protection des génomes contre leurs effets mutagènes, serait grandement facilité par l'isolement de nouveaux éléments LINE fonctionnels. La caractérisation et la

localisation d'un tel élément ont été rapportés dans cette thèse. La méthylation des sites CpG est un des mécanismes de régulation épigénétique de ces éléments. Un modèle hypothétique de régulation épigénétique de l'allèle *A^{br}* a été présenté. Il rend compte de la modification du patron de méthylation de l'élément LINE par l'activation répétée des promoteurs *Agouti* situés en amont. Ce modèle permettra d'étudier les mécanismes fondamentaux de régulation épigénétique des génomes qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement, l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X, et certains cancers.

Références

- 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: 395-398.
- ANDERSON, D. E., 1991 Genetic study of eye cancer in cattle. *J Hered* 82: 21-26.
- ANDERSON, D. M., S. D. LYMAN, A. BAIRD, J. M. WIGNALL, J. EISENMAN et al., 1990 Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 63: 235-243.
- ARGESON, A. C., K. K. NELSON and L. D. SIRACUSA, 1996 Molecular basis of the pleiotropic phenotype of mice carrying the hypervariable yellow (Ahvy) mutation at the agouti locus. *Genetics* 142: 557-567.
- ATHANIKAR, J. N., R. M. BADGE and J. V. MORAN, 2004 A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res* 32: 3846-3855.
- BARBOT, W., A. DUPRESSOIR, V. LAZAR and T. HEIDMANN, 2002 Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Res* 30: 2365-2373.
- BARSH, G., 1999 From Agouti to Pomc--100 years of fat blonde mice. *Nat Med* 5: 984-985.
- BARSH, G. S., 1996 The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 12: 299-305.
- BARSH, G. S., M. LOVETT and C. J. EPSTEIN, 1990 Effects of the lethal yellow (Ay) mutation in mouse aggregation chimeras. *Development* 109: 683-690.
- BEATO, M., 1996 Chromatin structure and the regulation of gene expression: remodeling at the MMTV promoter. *J Mol Med* 74: 711-724.
- BECERRIL, C. M., C. J. WILCOX, G. R. WIGGANS and K. N. SIGMON, 1994 Transformation of measurements percentage of white coat color for Holsteins and estimation of heritability. *J Dairy Sci* 77: 2651-2657.
- BENNETT, D. C., and M. L. LAMOREUX, 2003 The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* 16: 333-344.
- BHATNAGAR, V., S. ANJIAH, N. PURI, B. N. DARSHANAM and A. RAMAIAH, 1993 pH of melanosomes of B 16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 307: 183-192.
- BIRD, A. P., and A. P. WOLFFE, 1999 Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99: 451-454.
- BOLOGNIA, J. L., J. L. JORIZZO and R. RAPINI, 2003 *Dermatology*. Elsevier.
- BULTMAN, S. J., M. L. KLEBIG, E. J. MICHAUD, H. O. SWEET, M. T. DAVISSON et al., 1994 Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. *Genes Dev* 8: 481-490.
- BULTMAN, S. J., E. J. MICHAUD and R. P. WOYCHIK, 1992 Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71: 1195-1204.
- CHARLIER, C., B. DENYS, J. I. BELANCHE, W. COPPIETERS, L. GROBET et al., 1996 Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer disease. *Mamm Genome* 7: 138-142.

- CHHAJLANI, V., and J. E. WIKBERG, 1992 Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309: 417-420.
- CHOI, Y. B., J. K. KO and J. SHIN, 2004 The transcriptional corepressor, PELP1, recruits HDAC2 and masks histones using two separate domains. *J Biol Chem* 279: 50930-50941.
- DEININGER, P. L., J. V. MORAN, M. A. BATZER and H. H. KAZAZIAN, JR., 2003 Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 13: 651-658.
- DU, J., A. J. MILLER, H. R. WIDLUND, M. A. HORSTMANN, S. RAMASWAMY et al., 2003 MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 163: 333-343.
- DUKE-COHAN, J. S., J. GU, D. F. MCLAUGHLIN, Y. XU, G. J. FREEMAN et al., 1998 Attractin (DPPT-L), a member of the CUB family of cell adhesion and guidance proteins, is secreted by activated human T lymphocytes and modulates immune cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11336-11341.
- EPSTEIN, D. J., K. J. VOGAN, D. G. TRASLER and P. GROS, 1993 A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 532-536.
- FRIGERI, L. G., G. L. WOLFF and G. ROBEL, 1983 Impairment of glucose tolerance in yellow (Avy/A) (BALB/c X VY) F-1 hybrid mice by hyperglycemic peptide(s) from human pituitary glands. *Endocrinology* 113: 2097-2105.
- FRIGERI, L. G., G. L. WOLFF and C. TEGUH, 1988 Differential responses of yellow Avy/A and agouti A/a (BALB/c X VY) F1 hybrid mice to the same diets: glucose tolerance, weight gain, and adipocyte cellularity. *Int J Obes* 12: 305-320.
- GANTZ, I., H. MIWA, Y. KONDA, Y. SHIMOTO, T. TASHIRO et al., 1993a Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268: 15174-15179.
- GANTZ, I., T. TASHIRO, C. BARCROFT, Y. KONDA, Y. SHIMOTO et al., 1993b Localization of the genes encoding the melanocortin-2 (adrenocorticotrophic hormone) and melanocortin-3 receptors to chromosomes 18p11.2 and 20q13.2-q13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 18: 166-167.
- GIUFFRA, E., G. EVANS, A. TORNSTEN, R. WALES, A. DAY et al., 1999 The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant white (I/KIT) locus. *Mamm Genome* 10: 1132-1136.
- GODING, C. R., 2000 Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14: 1712-1728.
- GROSZ, M. D., and M. D. MACNEIL, 1999 The «spotted» locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-Cross population. *J Hered* 90: 233-236.
- GUIBERT, S., M. GIRARDOT, H. LEVEZIEL, R. JULIEN and A. OULMOUDEN, 2004 Pheomelanin Coat Colour Dilution in French Cattle Breeds is not Correlated with the TYR, TYRP1 and DCT Transcription Levels. *Pigment Cell Research* 17: 337-345.
- GUNN, T. M., K. A. MILLER, L. HE, R. W. HYMAN, R. W. DAVIS et al., 1999 The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* 398: 152-156.

- HAGER, G. L., 2001 Understanding nuclear receptor function: from DNA to chromatin to the interphase nucleus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 279-305.
- HASKELL-LUEVANO, C., R. D. CONE, E. K. MONCK and Y. P. WAN, 2001 Structure activity studies of the melanocortin-4 receptor by in vitro mutagenesis: identification of agouti-related protein (AGRP), melanocortin agonist and synthetic peptide antagonist interaction determinants. *Biochemistry* 40: 6164-6179.
- HATA, K., and Y. SAKAKI, 1997 Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 189: 227-234.
- HE, L., T. M. GUNN, D. M. BOULEY, X. Y. LU, S. J. WATSON et al., 2001 A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity. *Nat Genet* 27: 40-47.
- HE, L., X. Y. LU, A. F. JOLLY, A. G. ELDRIDGE, S. J. WATSON et al., 2003 Spongiform degeneration in mahoganoid mutant mice. *Science* 299: 710-712.
- HELLEN, C. U., and P. SARNOW, 2001 Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15: 1593-1612.
- HELLERSTROM, C., and B. HELLMAN, 1963 The Islets of Langerhans in yellow obese mice. *Metabolism* 12: 527-536.
- HENDRICH, B., and A. BIRD, 1998 Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18: 6538-6547.
- HOASHI, T., H. WATABE, J. MULLER, Y. YAMAGUCHI, W. D. VIEIRA et al., 2005 Mart-1 is required for the function of melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem*.
- HUBER, W. E., E. R. PRICE, H. R. WIDLUND, J. DU, I. J. DAVIS et al., 2003 A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* 278: 45224-45230.
- HUDDER, A., and R. WERNER, 2000 Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene. *J Biol Chem* 275: 34586-34591.
- HUME, A. N., L. M. COLLINSON, C. R. HOPKINS, M. STROM, D. C. BARRAL et al., 2002 The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic* 3: 193-202.
- IMOKAWA, G., T. KOBAYASHI and M. MIYAGISHI, 2000 Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J Biol Chem* 275: 33321-33328.
- JACKSON, I. J., 1994 Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet* 28: 189-217.
- JACKSON, I. J., 1997 Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Hum Mol Genet* 6: 1613-1624.
- 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: 7010-7014.

- 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: 451-459.
- JACKSON, I. J., D. M. CHAMBERS, K. TSUKAMOTO, N. G. COPELAND, D. J. GILBERT et al., 1992 A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *Embo J* 11: 527-535.
- JIMBOW, K., J. S. PARK, F. KATO, K. HIROSAKI, K. TOYOFUKU et al., 2000 Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res* 13: 222-229.
- 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: 317-318.
- JONES, B. H., J. H. KIM, M. B. ZEMEL, R. P. WOYCHIK, E. J. MICHAUD et al., 1996 Upregulation of adipocyte metabolism by agouti protein: possible paracrine actions in yellow mouse obesity. *Am J Physiol* 270: E192-196.
- JONES, P. L., G. J. VEENSTRA, P. A. WADE, D. VERMAAK, S. U. KASS et al., 1998 Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19: 187-191.
- JORDAN, S. A., and I. J. JACKSON, 2000 MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev Biol* 225: 424-436.
- KANETSKY, P. A., J. SWOYER, S. PANOSSIAN, R. HOLMES, D. GUERRY et al., 2002 A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation, pp. 770-775 in *Am J Hum Genet*.
- KELLEHER, J. F., and M. A. TITUS, 1998 Intracellular motility: how can we all work together? *Curr Biol* 8: R394-397.
- KIM, J. H., L. L. KIEFER, R. P. WOYCHIK, W. O. WILKISON, A. TRUESDALE et al., 1997 Agouti regulation of intracellular calcium: role of melanocortin receptors. *Am J Physiol* 272: E379-384.
- KIM, J. H., R. L. MYNATT, J. W. MOORE, R. P. WOYCHIK, N. MOUSTAID et al., 1996 The effects of calcium channel blockade on agouti-induced obesity. *Faseb J* 10: 1646-1652.
- KIMBERLAND, M. L., V. DIVOKY, J. PRCHAL, U. SCHWAHN, W. BERGER et al., 1999 Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* 8: 1557-1560.
- KLEBIG, M. L., J. E. WILKINSON, J. G. GEISLER and R. P. WOYCHIK, 1995 Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4728-4732.
- 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: 636-639.
- KWON, H. Y., S. J. BULTMAN, C. LOFFLER, W. J. CHEN, P. J. FURDON et al., 1994 Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene, pp. 9760-9764 in *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- LABBE, O., F. DESARNAUD, D. EGGERICKX, G. VASSART and M. PARMENTIER, 1994 Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 33: 4543-4549.

- 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: 287-299.
- LAUVERGNE, J. J., 1966 Génétique de la couleur du pelage des bovins domestiques. *Bibliographica Genetica* 20: 1-168.
- LINNEKIN, D., 1999 Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1053-1074.
- LOFTUS, S. K., D. M. LARSON, L. L. BAXTER, A. ANTONELLIS, Y. CHEN et al., 2002 Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4471-4476.
- LU, D., D. WILLARD, I. R. PATEL, S. KADWELL, L. OVERTON et al., 1994 Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
- MANNE, J., A. C. ARGESON and L. D. SIRACUSA, 1995 Mechanisms for the pleiotropic effects of the agouti gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4721-4724.
- MARTINEAU, Y., C. LE BEC, L. MONBRUN, V. ALLO, I. M. CHIU et al., 2004 Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol* 24: 7622-7635.
- MATSUNAGA, N., V. VIRADOR, C. SANTIS, W. D. VIEIRA, M. FURUMURA et al., 2000 In situ localization of agouti signal protein in murine skin using immunohistochemistry with an ASP-specific antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 176-182.
- MAYER, T. C., 1973 The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol* 34: 39-46.
- MCGILL, G. G., M. HORSTMANN, H. R. WIDLUND, J. DU, G. MOTYCKOVA et al., 2002 Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109: 707-718.
- MCNULTY, J. C., P. J. JACKSON, D. A. THOMPSON, B. CHAI, I. GANTZ et al., 2005 Structures of the agouti signaling protein. *J Mol Biol* 346: 1059-1070.
- MICHAUD, E. J., S. J. BULTMAN, M. L. KLEBIG, M. J. VAN VUGT, L. J. STUBBS et al., 1994a A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2562-2566.
- MICHAUD, E. J., S. J. BULTMAN, L. J. STUBBS and R. P. WOYCHIK, 1993 The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. *Genes Dev* 7: 1203-1213.
- MICHAUD, E. J., M. J. VAN VUGT, S. J. BULTMAN, H. O. SWEET, M. T. DAVISSON et al., 1994b Differential expression of a new dominant agouti allele (Aiapy) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. *Genes Dev* 8: 1463-1472.
- MILLAR, S. E., M. W. MILLER, M. E. STEVENS and G. S. BARSH, 1995 Expression and transgenic studies of the mouse agouti gene provide insight into the mechanisms by which mammalian coat color patterns are generated. *Development* 121: 3223-3232.
- MILLER, K. A., T. M. GUNN, M. M. CARRASQUILLO, M. L. LAMOREUX, D. B. GALBRAITH et al., 1997 Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* 146: 1407-1415.

- MILLER, M. W., D. M. DUHL, H. VRIELING, S. P. CORDES, M. M. OLLMANN et al., 1993 Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev* 7: 454-467.
- MILTENBERGER, R. J., R. L. MYNATT, B. D. BRUCE, W. O. WILKISON, R. P. WOYCHIK et al., 1999 An agouti mutation lacking the basic domain induces yellow pigmentation but not obesity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8579-8584.
- 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: 314-318.
- 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: 1248-1251.
- MYNATT, R. L., R. J. MILTENBERGER, M. L. KLEBIG, M. B. ZEMEL, J. E. WILKINSON et al., 1997 Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 919-922.
- MYNATT, R. L., and J. M. STEPHENS, 2001 Agouti regulates adipocyte transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C954-961.
- MYNATT, R. L., and J. M. STEPHENS, 2003 Regulation of PPARgamma and obesity by agouti/melanocortin signaling in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci* 994: 141-146.
- NAGLE, D. L., S. H. MCGRAIL, J. VITALE, E. A. WOOLF, B. J. DUSSAULT, JR. et al., 1999 The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* 398: 148-152.
- NAN, X., H. H. NG, C. A. JOHNSON, C. D. LAHERTY, B. M. TURNER et al., 1998 Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389.
- OLIVERA, B. M., G. P. MILJANICH, J. RAMACHANDRAN and M. E. ADAMS, 1994 Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63: 823-867.
- OLLMANN, M. M., and G. S. BARSH, 1999 Down-regulation of melanocortin receptor signaling mediated by the amino terminus of Agouti protein in *Xenopus* melanophores. *J Biol Chem* 274: 15837-15846.
- OLLMANN, M. M., M. L. LAMOREUX, B. D. WILSON and G. S. BARSH, 1998 Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev* 12: 316-330.
- OLLMANN, M. M., B. D. WILSON, Y. K. YANG, J. A. KERNS, Y. CHEN et al., 1997 Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.
- OLSON, T. A., 1982 Inheritance of coat colour in cattle: a review. Iowa State university and agricultural experiment station bulletin 595, Iowa.
- OLSON, T. A., 1999 The genetics of Cattle. CAB International, Wallingford, Oxon.
- ORLOW, S. J., 1995 Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 105: 3-7.

- PAVAN, W. J., and S. M. TILGHMAN, 1994 Piebald lethal (sl) acts early to disrupt the development of neural crest-derived melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7159-7163.
- PELLETIER, J., and N. SONENBERG, 1988 Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.
- PERRY, W. L., N. G. COPELAND and N. A. JENKINS, 1994 The molecular basis for dominant yellow agouti coat color mutations. *Bioessays* 16: 705-707.
- PERRY, W. L., T. NAKAMURA, D. A. SWING, L. SECREST, B. EAGLESON et al., 1996 Coupled site-directed mutagenesis/transgenesis identifies important functional domains of the mouse agouti protein. *Genetics* 144: 255-264.
- POTTERF, S. B., M. FURUMURA, K. J. DUNN, H. ARNHEITER and W. J. PAVAN, 2000 Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet* 107: 1-6.
- PROVANCE, D. W., T. L. JAMES and J. A. MERCER, 2002 Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic* 3: 124-132.
- RAO, C., D. FOERNZLER, S. K. LOFTUS, S. LIU, J. D. MCPHERSON et al., 2003 A defect in a novel ADAMTS family member is the cause of the belted white-spotting mutation. *Development* 130: 4665-4672.
- ROBBINS, L. S., J. H. NADEAU, K. R. JOHNSON, M. A. KELLY, L. ROSELLI-REHFUSS et al., 1993 Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72: 827-834.
- 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: 165-168.
- ROSELLI-REHFUSS, L., K. G. MOUNTJOY, L. S. ROBBINS, M. T. MORTRUD, M. J. LOW et al., 1993 Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8856-8860.
- ROSSI, M., M. S. KIM, D. G. MORGAN, C. J. SMALL, C. M. EDWARDS et al., 1998 A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-4431.
- ROUZAUD, F., J. P. ANNEREAU, J. C. VALENCIA, G. E. COSTIN and V. J. HEARING, 2003 Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist. *Faseb J* 17: 2154-2156.
- ROUZAUD, F., J. MARTIN, P. F. GALLET, D. DELOURME, V. GOULEMOT-LEGER et al., 2000 A first genotyping assay based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet Sel Evol* 32: 511-520.
- SAKAI, L. Y., D. R. KEENE, R. W. GLANVILLE and H. P. BACHINGER, 1991 Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem* 266: 14763-14770.
- SALEM, M. A., U. J. LEWIS, L. S. HARO, K. KISHI, D. L. MCALLISTER et al., 1989 Effects of hypophysectomy and the insulin-like and anti-insulin pituitary peptides on carbohydrate metabolism in yellow Avy/A (BALB/c x VY)F1 hybrid mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 191: 408-419.

- SALEM, M. A., and G. L. WOLFF, 1989 Potentiation of response to insulin and anti-insulin action by two human pituitary peptides in lean agouti A/a, obese yellow Avy/A, and C57BL/6J-ob/ob mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 191: 113-123.
- SASSAMAN, D. M., B. A. DOMBROSKI, J. V. MORAN, M. L. KIMBERLAND, T. P. NAAS et al., 1997 Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16: 37-43.
- SCHMUTZ, S. M., T. G. BERRYERE, N. M. ELLINWOOD, J. A. KERNS and G. S. BARSH, 2003 MC1R studies in dogs with melanistic mask or brindle patterns. *J Hered* 94: 69-73.
- SCHUBELER, D., M. C. LORINCZ, D. M. CIMBORA, A. TELLING, Y. Q. FENG et al., 2000 Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 20: 9103-9112.
- SEARLE, A. G., 1968 Comparative genetics of coat colour in mammals. Logos Press, London.
- 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: 710-712.
- SHIN, M. K., J. M. LEVORSE, R. S. INGRAM and S. M. TILGHMAN, 1999 The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402: 496-501.
- SHUTTER, J. R., M. GRAHAM, A. C. KINSEY, S. SCULLY, R. LUTHY et al., 1997 Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11: 593-602.
- SIRACUSA, L. D., 1994 The agouti gene: turned on to yellow. *Trends Genet* 10: 423-428.
- STINCHCOMBE, J. C., and G. M. GRIFFITHS, 1999 Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* 147: 1-6.
- SUMIDA, T., N. HINO, H. KAWACHI, T. MATSUI and H. YANO, 2004 Expression of agouti gene in bovine adipocytes. *Animal Science Journal* 75: 49-51.
- SUZUKI, I., R. D. CONE, S. IM, J. NORDLUND and Z. A. ABDEL-MALEK, 1996 Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 137: 1627-1633.
- TAMATE, H. B., and T. TAKEUCHI, 1984 Action of the e locus of mice in the response of phaeomelanin hair follicles to alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro. *Science* 224: 1241-1242.
- TANG, B. L., 2001 ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 33-44.
- TCHENIO, T., J. F. CASELLA and T. HEIDMANN, 2000 Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Res* 28: 411-415.
- VAGNER, S., B. GALY and S. PYRONNET, 2001 Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2: 893-898.
- VOISEY, J., N. F. BOX and A. VAN DAAL, 2001 A polymorphism study of the human Agouti gene and its association with MC1R. *Pigment Cell Res* 14: 264-267.

- VOISEY, J., and A. VAN DAAL, 2002 Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 15: 10-18.
- VRIELING, H., D. M. DUHL, S. E. MILLAR, K. A. MILLER and G. S. BARSH, 1994 Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5667-5671.
- WARBRITTON, A., A. M. GILL, T. T. YEN, T. BUCCI and G. L. WOLFF, 1994 Pancreatic islet cells in preobese yellow *Avy*^{-/-} mice: relation to adult hyperinsulinemia and obesity. *Proc Soc Exp Biol Med* 206: 145-151.
- WEHRLE-HALLER, B., and J. A. WESTON, 1995 Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 121: 731-742.
- WILCZYNSKI, A., X. S. WANG, C. G. JOSEPH, Z. XIANG, R. M. BAUZO et al., 2004 Identification of putative agouti-related protein(87-132)-melanocortin-4 receptor interactions by homology molecular modeling and validation using chimeric peptide ligands. *J Med Chem* 47: 2194-2207.
- WILKIE, A. L., S. A. JORDAN and I. J. JACKSON, 2002 Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development* 129: 3349-3357.
- WILLARD, D. H., W. BODNAR, C. HARRIS, L. KIEFER, J. S. NICHOLS et al., 1995 Agouti structure and function: characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist. *Biochemistry* 34: 12341-12346.
- WILSON, B. D., M. M. OLLMANN, L. KANG, M. STOFFEL, G. I. BELL et al., 1995 Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 4: 223-230.
- WOLFF, G. L., D. L. GREENMAN, L. G. FRIGERI, R. L. MORRISSEY, R. L. SUBER et al., 1990 Diabetogenic response to streptozotocin varies among obese yellow and among lean agouti (BALB/c x VY)F1 hybrid mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 193: 155-163.
- WOLFF, G. L., D. W. ROBERTS and D. B. GALBRAITH, 1986 Prenatal determination of obesity, tumor susceptibility, and coat color pattern in viable yellow (*Avy/a*) mice. The yellow mouse syndrome. *J Hered* 77: 151-158.
- WOODCOCK, D. M., C. B. LAWLER, M. E. LINSENMEYER, J. P. DOHERTY and W. D. WARREN, 1997 Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272: 7810-7816.
- WU, X., F. WANG, K. RAO, J. R. SELLERS and J. A. HAMMER, 3RD, 2002 Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol Biol Cell* 13: 1735-1749.
- XUE, B. Z., W. O. WILKISON, R. L. MYNATT, N. MOUSTAID, M. GOLDMAN et al., 1999 The agouti gene product stimulates pancreatic [beta]-cell Ca²⁺ signaling and insulin release. *Physiol Genomics* 1: 11-19.
- 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: 158-169.
- YAMAN, I., J. FERNANDEZ, H. LIU, M. CAPRARA, A. A. KOMAR et al., 2003 The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 113: 519-531.
- YANG, Y. K., T. M. FONG, C. J. DICKINSON, C. MAO, J. Y. LI et al., 2000 Molecular determinants of ligand binding to the human melanocortin-4 receptor. *Biochemistry* 39: 14900-14911.

- YASUMOTO, K., H. WATABE, J. C. VALENCIA, T. KUSHIMOTO, T. KOBAYASHI et al., 2004 Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J Biol Chem* 279: 28330-28338.
- 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: 503-509.
- YEN, T. T., A. M. GILL, L. G. FRIGERI, G. S. BARSH and G. L. WOLFF, 1994 Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow *A(vy)/-* mice: ectopic expression of the *agouti* gene. *Faseb J* 8: 479-488.
- YODER, J. A., C. P. WALSH and T. H. BESTOR, 1997 Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-340.
- YOSHIDA, H., T. KUNISADA, M. KUSAKABE, S. NISHIKAWA and S. I. NISHIKAWA, 1996 Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development* 122: 1207-1214.
- ZUKER, M., 2003 Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415.

Annexes

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

Index

Symboles

5-S et 2-S-cysteinylDOPA 11

α -MSH 12, 17, 18, 30, 97

A

a 18, 23

A^+ 17

A^{br} 65, 99, 106, 107, 108

acétylation des histones 102

Agrp 27, 57

A^{hvy} 24, 25, 99

a^i 18

A^{iapy} 24, 25

A^{iy} 24

Albino 9, 18, 23

allèle e 13, 15, 17, 18

AMPc 17

Angus 21

A^{pb} 18

ASIP 30

ASP 13

a^t 23

Atrn 31

Attractine 31, 55, 97, 99, 105, 106, 109

Aubrac 17

aurochs 15

A^{vy} 24, 25, 26, 65, 99

A^w 18, 23, 24

A^y 24, 26, 32, 44, 56, 97, 99

Ayshire 21

B

baculovirus 103

Belted 21

Belted Galloway 21

Blanc bleu belge 20

Blaze 20

Bos Taurus 15

BOVMAP 1

Br 18

bringeure 2, 18, 33, 65, 66, 99, 109

Brockling 21

brown 9

Brown Swiss 18

BSA 40

Bt 8

C

c-Kit 7

cat-1 59

Charcot-Marie-Tooth, maladie de 61

Charolaise 1, 19, 36, 105

Chinchilla 19

chocolate 9

Connexin-32 61

conotoxin 29

CpG 25, 101, 110

CREB 7, 13

crête neurale 5

croisements Prim'Holstein X Normande 66, 97, 108

CUB 31

D

Dc 19

Dct 5, 7, 9, 11, 13, 97

de-silencing 101, 102

DHI 11

DHICA 11

diabète 24, 26, 108

Dilute 12, 19

DNase 37

Dølafe 18

Dominant white-spotting 7

DOPA 11

DOPAquinone 11

Dutch Belted 21

E

E^+ 15, 17, 97

E^i 17

E^D 13,15,17,18

Edn3 5,8

Ednrb 5,7,8

EGF 31,106

épiderme 5

épigénétiques 25,101,110

ER 102

ERE 102

eumélanines 11,12,17,44

Extension 12,17,33,65,97

extrémités dendritiques 12

F

FAS 26

FGF-1 61

follicules pileux 5,12,13,21

G

Gasconne 17

GR 102

GRE 102

GSP 37

H

HAT 102

HDAC 101,102

Herd-book 1,33

Hereford 19,20,21

Highland 19

hyperglycémie 24

hyperphagie 24

I

IAP 24,25,65,99,101

IRES 59

ITAF 61

J

JAK/STAT 7

Jersey 18,21

K

kératinocytes 12

Kit 5,7,20,21

Kitl 5,7

Kozac 59

L

L1 99

LacZ 5

Lascaux 15

lectine 31

Lethal-spotting 7

Lethal yellow 24

Limousine 1,17,18,36,105

LINE 25,31,99,105,109

locus *Agouti* 17

locus *Bringé* 18

LTR 24,25,101,102

M

m-fold 59

m.nocturnin 101

Mahoganoïd 13,31,32,97,99

Mahogany 13,31,99

Maine-Anjou 19

MAP Kinases 7,8

Mart-1 13

MBD 25

Mc1r 12,17,23,29,30,97

Mc2r 26

Mc3r 27

Mc4r 27,29,56,99

Mc5r 27

MeCP2 101

mélanines 5,9,12,107

mélanoblastes 5,8,21

mélanocyte 5,7,9,12,17,20,21,30

mélanogenèse 7,9,12

Mélanophilin 12

mélanosome 9,12,107

mélanosome de type III 9

Mendel, Gregor 1,3

méthylation 25,101,102,110

mg 13

MGF 7,20

microtubules 12

Mitf 5,7,13

Monbéliarde 1,19

Myosin-Va 12

N

NF-1 102

NF κ B 102

Normande 2, 18, 19, 21, 33, 36, 65, 66, 97, 99, 105, 107, 108

Northern blot 39,56

NUP 37

O

obésité 2,24,26,44,61,97,99,108

Oct-1 102

P

Pax3 5,7

PELP1 102

phanères 2

pheomélanines 11,12,17,44,99

PI3 Kinases 7

pie 19,20

piebald 7,19

Piedbal-lethal 7

Pin-au-Haras 36

Pinzgauer 20

PKC 8

plectoxin 29

Pmel17 9,13

PPAR- γ 26

Prim'Holstein 1,17,18,19,20,36,99,105

R

Rab38 9

RACE-PCR 37

Raly 24

rétrotransposons 25,101,109

RING 32

RMN 30

Roan 20,21

rouge Norvégienne 21

RT-PCR semi quantitatives 37

S

s 20

Salers 1,36

SCF 7

SDS-PAGE 40

S^H 20

Shorthorn 20

Silver 7,19

Simmental 19,20

SINE 25

site actif 55

S^L 7

slaty 9

sonde 39,57

Southern blot 39,57,101

Sox10 5,7,13

S^P 20,21

SRY 101

stade II (mélanosome) 9

stade IV (mélanosome) 9

stade I (mélanosome) 9

STAT 26

Steel 7

switch 12,44

T

test génétique 108

Texas Longhorn 18

TGN 9

traçabilité 108

tumeurs 24,26,108

Tyrosinase 7,11,13,17,97

Tyrp1 7,9,11,13,65,97

U

uORF 59

UPRA 36

V

VL30 23,24

W

W 7

Western blot 41, 105, 106

white-spotting 5, 19

White Heifer Disease 20

Y

YY1 101

Z

zébu 18

Génétique moléculaire de la coloration : Découverte d'un nouvel allèle A^{br} du gène *Agouti* responsable de la bringeure de la race bovine Normande.

L'objectif de ce projet de recherche est l'identification de marqueurs moléculaires dans les gènes de coloration qui pourraient être utilisés pour la traçabilité des produits d'origine bovine. Parmi les gènes de coloration, *Agouti* code pour une protéine antagoniste de la fixation de l'hormone α -MSH sur le récepteur aux mélanocortines 1 (*Mc1r*), codé par le gène *Extension*, et permet le « switch » de la synthèse d'eumélanine (noir/marron) vers la synthèse de pheomélanine (jaune/rouge), dans les mélanocytes de la peau. Nous démontrons dans ce travail que trois promoteurs alternatifs dirigent l'expression de transcrits, porteurs de régions 5'UTRs différentes, dans de nombreux tissus, ce qui suggère un rôle probable d'Agouti dans différentes fonctions physiologiques, en plus de la coloration chez le bovin. La race Normande, de génotype *Extension* sauvage (E^+/E^+), a un phénotype bringé. La bringeure est une présence variable de poils noirs sur un fond coloré rouge/brun. Le gène *Agouti* est surexprimé chez la Normande. Un élément de type LINE, inséré dans la région 5' génomique, provoque la surexpression de transcrits alternatifs. Le niveau de méthylation de l'élément LINE est responsable de la répression aléatoire du gène *Agouti* dans la peau Normande. Ce nouvel allèle *Agouti* (A^{br}) est présent à l'état homozygote dans la race Normande. Enfin, l'immunodétection dans la peau bovine a révélé une forme libre tétramérique de la protéine Agouti et une forme liée à une protéine de grande taille.

Mots-clés : Agouti, pigmentation, races bovines, LINE, méthylation.

Molecular colour genetics: Discovery of a new allele A^{br} of the *Agouti* gene responsible of the brindle pattern of the Normande bovine breed.

The aim of this research project is the identification of molecular markers in coat-colour genes which could be used for bovine products traceability. Within coat colour genes, *Agouti* encodes an antagonist protein for the α -MSH hormone binding to the melanocortin 1 receptor (*Mc1r*), coding by the *Extension* gene, and allows the switch from the eumelanin (black/brown) synthesis to the pheomelanin (yellow/red) synthesis, in skin melanocytes. Here we show that three alternative promoters directs the widespread expression of transcripts, differing in their 5'UTR regions, which suggests a putative role of Agouti in others physiological functions, besides pigmentation in bovine. The Normande breed, wild type at the *Extension* locus (E^+/E^+), displays a brindle pattern. This pattern is defined by a variable presence of black hairs over a red/brown background. The *Agouti* gene is over-expressed in Normande breed. A LINE element, inserted in the 5' genomic sequence, promotes the over-expression of *Agouti* alternative transcripts. The methylation status of the LINE element is responsible for the variegated expression accounting for the brindle coat colour pattern. Finally, immunodetection in bovine skin reveals a tetramer of Agouti and an Agouti protein linked to a high sized protein.

Key words: Agouti, pigmentation, cattle, LINE, methylation.