

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé
Faculté des Sciences et Techniques
Institut des Sciences de la Vie et de la Santé
Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA

Thèse N° 60-2008

Thèse

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

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par
Abdul Waheed Nizamani

Le 30 Octobre 2008

Pigmentation de la peau chez le bovin :
Etude du polymorphisme et de l'expression du gène *PAR-2*

Directeur de Thèse : Ahmad OULMOUDEN

Jury :

<u>Rapporteurs</u> :	M^{me} Michèle TIXIER-BOICHARD	Directeur de Recherche, INRA
	M^r Philippe MULSANT	Directeur de Recherche, INRA
<u>Examineurs</u> :	M^r Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherches, INRA
	M^r Carlo RENIERI	Professeur, Université, Camerino
	M^r Ahmad OULMOUDEN	Professeur, Université, Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé
Faculté des Sciences et Techniques
Institut des Sciences de la Vie et de la Santé
Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA

Thèse N° 60-2008

Thèse

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

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue par

Abdul Waheed Nizamani

Le 30 Octobre 2008

Pigmentation de la peau chez le bovin :
Etude du polymorphisme et de l'expression du gène *PAR-2*

Directeur de Thèse : Ahmad OULMOUDEN

Jury :

<u>Rapporteurs</u> :	M^{me} Michèle TIXIER-BOICHARD	Directeur de Recherche, INRA
	M^r Philippe MULSANT	Directeur de Recherche, INRA
<u>Examineurs</u> :	M^r Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherches, INRA
	M^r Carlo RENIERI	Professeur, Université, Camerino
	M^r Ahmad OULMOUDEN	Professeur, Université, Limoges

*A mes enfants, Mahnoor et Burhan
A Talat*

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : Madame Michèle Tixier-Boichard et Monsieur Philippe Mulsant pour avoir accepté de juger mon travail, Monsieur Hubert Levéziel, Monsieur Carlo Renieri et Monsieur Ahmad Oulmouden.

Je remercie également Monsieur Raymond Julien et Monsieur Hubert Leveziel et Monsieur Abderrahman Maftah pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale. Je tiens à remercier le 'Higher Education Commission, Pakistan' (HEC) pour son soutien financier.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Ahmad Oulmouden pour avoir bien voulu être l'encadrant de cette thèse, pour ses précieux conseils, sa patience, son enthousiasme et surtout pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ce travail. Je tiens aussi à le remercier de sa grande disponibilité et pour m'avoir apporté rigueur scientifique et soutien au cours de ces années de recherche.

Je remercie Monsieur Olivier Fumière pour les travaux RFLP et Monsieur Silvano Presciuttini pour analyses statistiques. Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont soutenu au cours de ces années. Merci Lionel, le cœur du labo, pour ton soutien et ton amitié. Merci Pascal pour ton soutien, ta disponibilité et ton amitié. Merci Marie-Pierre pour ton assistance technique, ta disponibilité et ta bonne humeur. Merci François pour ta gentillesse, ton soutien, ton aide précieuse de tous les jours.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire ayant participé de près ou de loin à l'avancement de ma thèse. Je remercie tous les statutaires et thésards passés ou encore présents du laboratoire, pour l'apport de la bonne humeur. Merci Amro pour ton amitié. Merci Lamia et Anne pour votre amitié et votre joie de vivre. Merci à Aymeric, Aurélien, Renaud, Mathilde et Olivier pour votre amitié, votre écoute et vos encouragements. Merci Xavier pour ton amitié et tes conseils. A tous bonne continuation et bon courage pour la suite. J'aimerais remercier Mr. Jean Roger Rouffignac pour imprimer les manuscrits de thèse.

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans y associer ma famille pour son soutien inconditionnel tout au long de ces années et pour sa confiance. Merci de m'avoir accompagné et soutenu dans les bons et les mauvais moments de ma vie et donc de ma thèse.

Je terminerai en remerciant tous ceux qui, bien que non cités, conserveront une place chère dans mon cœur.

Abréviations

3'UTR : 3' UnTranslated Region	MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
5'UTR : 5' UnTranslated Region	MSC : Melanocyte Stem Cells
ACTH : Adrenocorticotripic Hormone	PARs : Proteinase Activated Receptors
ADN : Acide Désoxyribonucléique	PAX3 : Paired box gene 3
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire	pb : paire de bases
AP : Activating Peptide	PCR : Polymerase Chain Reaction
ARN : Acide Ribonucléique	PKA : Protein Kinase A
ATP : Adenosine Triphosphate	PKC : Protéine kinase C
Bcl2 : B-cell leukaemia/lymphoma 2	Pmel17 : Premelanosomal Protein 17
BSA : Albumine Sérique Bovine	PNGase : Peptide N-Glucosidase
Bt : Belted	Rab27a : member RAS oncogene family
cAMP : Cyclic Adénosine Mono Phosphate	RFLP : Restriction Fragment Length Polyporphism
CREB : cAMP responsive element binding protein	RT-PCR : Reverse trancription-PCR
DCT-lacZ : DopaChrome Tautomerase lacZ	SCF : Stem Cell Factor
DHI : 5, 6-dihydroxyindole	Ser : Serine
DHICA : 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid	SL : Steel factor
ECL2 : ExtraCellular Loop 2	Slc45a2 : Solute carrier family 45, member 2
Edn3 : Endothéline 3	SNARES : soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor adaptor proteins receptors
EDNRB : Endothelin Receptor B	SOX10 : Sex determining region Y box10
ER : Endoplasmic Réticulum	TEMED : TétraMéthylèneDiamine
ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase	Tyr : Tyrosinase
ET3 : Endothelin 3	Tyrp1 : Tyrosinase Related Protein 1
GFE : Gaine Folliculaire Externe	UMR : Unité Mixte de Recherche
GFI : Gaine Folliculaire Interne	UPRA : Unités Nationales de Sélection et de Promotion de Race
gp100 : Glycoprotéine 100	UV : Ultra Violate
GPCRs : G-Protein Coupled Receptors	VAMP : Vesicle Associated Membrane Proteins
GRKs : G-protein coupled receptor kinases	WNT : wingless (fruit fly mutation)
Kbp : Kilo paires bases	α -MSH : α -melanocyte-stimulating hormone
kDa : Kilo Dalton	
Kitl : Kit Ligand	
LB : Luria-Bertani	
L-DOPA : 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine	
Ls : Lethal Spotting	
Malph : Mélanophilin	
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase	
MART-1 : Melanoma Antigen Recognized by T-cells-1 also called Melan-A	
MC1R : Récepteur 1 aux Mélanocortines	
MEK : Mitogen-activated ERK activating Kinase	

Sommaire

I. Introduction	1
II. Exposé bibliographique	5
II.1. Le système tégumentaire	5
II.1.1. Structure de la peau	5
II.1.1.1. L'Épiderme	6
II.1.1.1.1. La couche basale	7
II.1.1.1.2. La couche épineuse	7
II.1.1.1.3. La couche granuleuse	7
II.1.1.1.4. La couche claire	7
II.1.1.1.5. La couche cornée	8
II.1.1.2. Les cellules pigmentaires de la peau	8
II.1.1.3. Annexes cutanées	8
II.1.1.3.1. Follicules pileux	8
A. Structure des follicules pileux	9
B. Croissance des poils	10
C. Développement des follicules pileux	11
II.1.1.1.4. Particularités de la peau murine	13
II.2. Le développement des mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires	14
II.3. Biogenèse du Mélanosome	20
II.4. Le transport des mélanosomes	23
II.5. Régulation de la pigmentation pileuse	24
II.6. Les mutations induisant une pigmentation de la peau noire chez la souris	27
II.7. La régulation de la pigmentation cutanée	28
II.7.1. Pigmentation constitutive de la peau	28
II.7.2. La régulation facultative de la pigmentation de la peau	30
II.8. Le transfert des mélanosomes aux keratinocytes : une étape clé de la pigmentation cutanée	32
II.8.1. Le transfert des mélanosomes le long des dendrites	32
II.8.2. Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes	32
II.8.2.1. L'exocytose	33
II.8.2.2. La cytophagocytose	34
II.8.2.3. La fusion des membranes plasmiques	34
II.8.2.4. Transfert via des vésicules membranaires	35
II.9. Rôle de <i>PAR-2</i> (<i>Proteinase Activated Receptor-2</i>) dans la pigmentation	36
II.9.1. Les gènes de la famille <i>PAR</i>	38
II.9.2. Mécanismes de l'activation des PARs	39
II.9.2.1. L'activation de PAR-2	40
II.9.2.2. Désactivation par d'autres protéases	41
II.9.2.3. Signalisation par PAR-1 et PAR-2	42
II.9.2.4. L'activations des PARs	43
II.9.2.5. Mécanismes de l'inactivation des PARs	43
II.9.2.5.1. Le clivage de PAR	44
II.9.2.5.2. La désensibilisation des PARs	45
II.9.2.5.3. L'endocytose et le trafic intracellulaire des PARs	46
II.9.2.5.4. 'Downregulation' des PARs	46
II.9.2.6. La glycosylation et la fonction des PARs	47
II.9.2.6.1. La N-glycosylation et les PARs	47
II.10. La coloration de la robe chez le bovin	48

II.10.1. Les patrons de coloration	48
II.10.1.1. Le déterminisme génétique des patrons de coloration chez le bovin	49
II.10.1.1.1. Le locus <i>Extension</i>	50
II.10.1.1.2. Le locus <i>AGOUTI</i>	52
II.10.1.1.3. Le locus <i>Bringé</i> (Brindle)	52
II.10.1.1.4. Le locus <i>Albino</i>	53
II.10.1.1.5. Le locus <i>Dun</i>	53
II.10.1.1.6. Le locus <i>Dilute</i>	53
II.10.1.1.7. Les mutations <i>white-spotting</i>	54
III. Projet d'étude	57
III.1. Contexte du projet	57
III.2. L'état actuel de la thématique	57
III.2.1. Le locus <i>Extension</i>	57
III.2.2. Le locus <i>AGOUTI</i>	58
III.2.3. Le locus <i>SILVER</i>	59
III.2.4. Exploitation des allèles identifiés pour la traçabilité bovine	60
III.3. Projet de thèse	61
IV. MATERIELS ET METHODES	63
IV.1. Matériel biologique	63
A. Les échantillons de peaux	63
B. Les échantillons de sang	63
C. Anticorps	63
IV.2. Préparation d'acides nucléiques	63
A. Préparations d'ARN totaux à partir de peau	63
B. Synthèse d'ADNc	64
C. Extraction d'ADN génomique bovin à partir de sang	64
IV.3. Préparation des protéines	65
A. Extraction de protéines de peau	65
B. Dosage des protéines	65
C. Traitement de protéines avec PNGase F	65
IV.4. Méthodes relatives aux acides nucléiques	67
A. Réaction de PCR	67
B. RT-PCR semi quantitative	67
C. PCR-RFLP	69
D. Electrophorèse en gel d'agarose	69
a. Electrophorèse en gel d'agarose	69
b. Purification de fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose	69
E. Séquençage	69
IV.5. Méthodes microbiologiques et génétiques	70
A. Conditions de culture des bactéries	70
B. Antibiotiques	70
C. Clonage de fragments d'ADN	71
a. Ligature	71
b. Transformation par choc thermique	71
D. Mini-préparation d'ADN plasmidiques d' <i>Escherichia coli</i>	71
IV.6. Western blot	72
A. Electrophorèse en Gel Tris Glycine	72

B. Transfert actif sur membrane de nitrocellulose	73
C. Hybridation des anticorps et lavages	73
D. Révélation	73
V. RESULTATS ET DISCUSSION	75
V.1. Obtention de la région codante du transcrit du gène <i>PAR-2</i>	75
V.1.1. Définition des amorces	75
V.1.2. Amplification par PCR et séquençage	75
V.2. Structure de <i>PAR-2</i>	77
V.3. Le récepteur <i>PAR-2</i>	77
V.4. Recherche de polymorphisme du gène <i>PAR-2</i>	80
V.4.1. Etude de la région codante	81
V.4.1.1. Amplification PCR de la région codante	81
V.4.1.2. Analyse des séquences et allèles identifiés	82
A. L'allèle <i>PAR-2</i>	82
B. L'allèle <i>par2.1</i>	83
C. L'allèle <i>par2.2</i>	83
V.5. Génotypage des allèles <i>PAR-2</i> bovin	85
V.6. Analyse de l'expression du gène <i>PAR-2</i> au niveau de la peau	89
V.6.1. Analyse de l'expression du gène <i>PAR-2</i> par PCR	89
V.6.2. Etude de l'expression du gène <i>PAR-2</i> par RT-PCR semi-quantitative	90
A. Définition des amorces	90
B. Niveau d'expression de <i>PAR-2</i>	90
V.7. Détection de la protéine <i>PAR-2</i>	91
V.7.1. Etude de la protéine chez la race Holstein	91
V.7.1.1. Traitement à la PNGase	92
V.7.1.2. Détection de <i>PAR-2</i> dans d'autres tissus que la peau	92
V.8. Etude de <i>PAR-2</i> au niveau de la peau de différentes races	93
VI. CONCLUSION	97
VII. REFERENCES	99

Tables des illustrations

Figure 1 : La couleur du pelage de rock pocket s'adapte aux couleurs de roches	1
Figure 2 : Changement saisonnier de la coloration du pelage	2
Figure 3 : Couleur du pelage du Sconce	2
Figure 4 : Histologie de la peau	5
Figure 5 : Différentes couches de l'épiderme	6
Figure 6 : Structure du poil	9
Figure 7 : Le cycle du poil	10
Figure 8 : La morphogenèse du poil	11
Figure 9 : Développement du mélanocyte	14
Figure 10 : Mise en évidence de la migration des Mélanoblastes d'embryon de souris exprimant DCT-LacZ	14
Figure 11 : Différentes phases du développement du poil	16
Figure 12 : Pelage agouti d'une souris sauvage et celui de l'ours blanc	17
Figure 13 : Voies Notch dans le renouvellement des mélanoblastes à partir des cellules souches	18
Figure 14 : Développement du mélanosome	20
Figure 15 : Quelques phénotypes du pelage de lignées de souris affectées dans les gènes impliqués directement dans la synthèse des pigments au sein du mélanosome	21
Figure 16 : Biosynthèse des mélanines	22
Figure 17 : Transport du mélanosome par le complexe Mélanosome-MyosinVa-Rab27-Mélanophilin	23
Figure 18 : Etablissement du phénotype agouti chez la souris	24
Figure 19 : Pelage de souris invalidée pour le gène <i>Corin</i> par rapport aux sauvages	26
Figure 20 : Les variations de la couleur de la peau humaine	28
Figure 21 : La peau noire et blanche	28
Figure 22 : Représentation schématique des récepteurs et leurs ligands ainsi que les autres facteurs qui régulent la pigmentation de la peau chez l'homme	29
Figure 23 : Représentation schématique de l'induction de la pigmentation facultative par les UVB	31
Figure 24 : Transfert des mélanosomes du mélanocyte vers le kératinocyte par exocytose	33
Figure 25 : La cytophagocytose	34
Figure 26 : La fusion des membranes plasmiques	35
Figure 27 : Transfert via des vésicules membranaires	35
Figure 28 : La synapse pigmentaire	37
Figure 29 : Représentation schématique de la structure de <i>PAR-1</i> , <i>PAR-2</i> et <i>PAR-3</i>	38
Figure 30 : Mécanisme d'activation des GPCRs	39
Figure 31 : Principaux sites de clivage de <i>PAR-1</i> , <i>PAR-2</i> et <i>PAR-3</i>	41
Figure 32 : Le Mécanisme de transductions du signal par <i>PARs</i>	42
Figure 33 : Mécanismes potentiels impliqués dans la désensibilisation et le trafic des <i>PARs</i>	44
Figure 34 : Quelques patrons de la coloration de la robe chez le bovin	48
Figure 35 : Phénotypes des robes des races Holstein, Angus et Aubrac	51
Figure 36 : Veau albino de race Brune	53
Figure 37 : Race Hereford porteuse de l'allèle S^H	54
Figure 38 : Phénotype Roan de la race Shorthorn	55
Figure 39 : Belted Galloway	56
Figure 40 : Allèles du gène <i>extension</i> impliqués dans différences de couleur de robe entre races ou groupes de races	58

Figure 41 : Schéma de la structure de l'allèle A^{br} du gène <i>AGOUTI</i> de la race Normande	59
Figure 42 : Représentation schématique des trois allèles <i>SI</i> , <i>si</i> et <i>si1</i> du gène SILVER/PMEL17 bovin	59
Figure 43 : Définitions des amorces	75
Figure 44 : Profil de l'électrophorèse en gel d'agarose de l'amplification par PCR de la région codante du gène <i>PAR-2</i> chez la Holstein	75
Figure 45 : Profil de l'électrophorèse en gel d'agarose du criblage par PCR de clones recombinants	77
Figure 46 : Structure schématique du gène <i>PAR-2</i> chez le bovin, l'homme, la souris et le Rat	76
Figure 47 : Séquence nucléotidique du cadre de lecture ouvert codant les 395 acides aminés qui compose le récepteur <i>PAR-2</i>	78
Figure 48 : Structure primaire du peptide activateur	79
Figure 49 : Modèle du récepteur <i>PAR-2</i>	80
Figure 50 : Amplification de la partie codante du gène <i>PAR-2</i> à partir de cDNA	81
Figure 51 : Localisation au sein de la région codante des mutations <i>PAR-2</i> identifiées	82
Figure 52 : Représentation schématique de l'approche PCR-RFLP utilisée	84
Figure 53 : Profil PCR-RFLP de l'électrophorèse en gel d'agarose obtenu par digestion <i>HindIII</i> ou <i>NlaIII</i>	84
Figure 54 : Comparaison des peptides activateurs	88
Figure 55 : Coloration de la robe et de la peau des races étudiées	89
Figure 56 : Amplification PCR à l'aide des amorces Parpur3 /Bparr5 sur des ADNc correspondants aux ARNs extraits des échantillons de peaux	90
Figure 57 : Détection de la protéine <i>PAR-2</i> par western blot en fonction de la quantité de protéine totale	91
Figure 58 : Profil du western blot obtenu pour deux échantillons l'un traité (H+) et l'autre non traité (H-) à la PNGase	92
Figure 59 : Profil du western blot	93
Figure 60 : Profil du western blot	93
Figure 61 : Profil du western blot réalisé avec 50µg de protéines	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Loci génétiques décrits chez le bovin	50
Tableau 2 : Races et groupes de races bovines identifiables actuellement par des tests ADN basés sur la combinatoire des allèles des gènes de coloration <i>Extension</i> , <i>Silver</i> et <i>Agouti</i>	60
Tableau 3 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage, séquençage	66
Tableau 4 : Oligonucléotides utilisées pour la RT-PCR semi-quantitative	66
Tableau 5 : Pourcentage d'identité entre les séquences codantes du gène <i>PAR-2</i>	76
Tableau 6 : Pourcentage d'identité des récepteurs <i>PAR-2</i> bovin, humain, souris et rat	79
Tableau 7 : Position des Sites potentiels de N-glycosylation	79
Tableau 8 : Fréquences des allèles <i>PAR-2</i> , <i>par2.1</i> et <i>par2.2</i> dans différentes races bovines européennes	86

I. INTRODUCTION

La pigmentation de la peau, des poils, des cheveux ou des yeux est un des caractères les plus visibles pour l'observateur tant chez l'homme que chez les animaux. Depuis de très nombreuses années, l'homme s'est attaché à comprendre les mystères de la coloration parfois fascinante ou intrigante. Gregor Mendel, le pionnier de la génétique, a découvert les lois de l'hérédité au 19^{ème} siècle en considérant entre autres des traits phénotypiques tels que la couleur des fleurs et du pois. Par ailleurs, la théorie chromosomique de Morgan (1911) a été le fruit de ses expériences sur la couleur des yeux de la drosophile (*Drosophila melanogaster*).

Chez les animaux sauvages, le rôle fondamental de la pigmentation externe est la protection contre les prédateurs mais elle peut être également utilisée comme signe de menace, d'avertissement ou d'alerte. Elle ne revêt donc pas seulement des aspects esthétiques mais assure également des fonctions biologiques dont parfois dépend la survie de l'individu.

En terme de camouflage, la souris Rock pocket (*Chaetodipus intermedius*) constitue un excellent exemple. Cet animal présente une variation de la couleur du pelage comme chez d'autres rongeurs du désert. Une forte corrélation (Majerus et Mundy, 2003) a été montrée entre la couleur du pelage et la couleur des roches de l'habitat de cette espèce de rongeur (**figure 1**).



Figure 1 : La couleur du pelage de rock pocket s'adapte aux différentes couleurs de roches (Majerus et Mundy, 2003).

Ces changements de couleurs permettent à l'animal une protection discrète contre les prédateurs et particulièrement contre le hibou. L'adaptation de la couleur du pelage au milieu est particulièrement perfectionnée chez les mammifères où les mues saisonnières donnent un pelage coloré en été et blanc en hiver (Lièvre, Hermine) (**figure 2**).

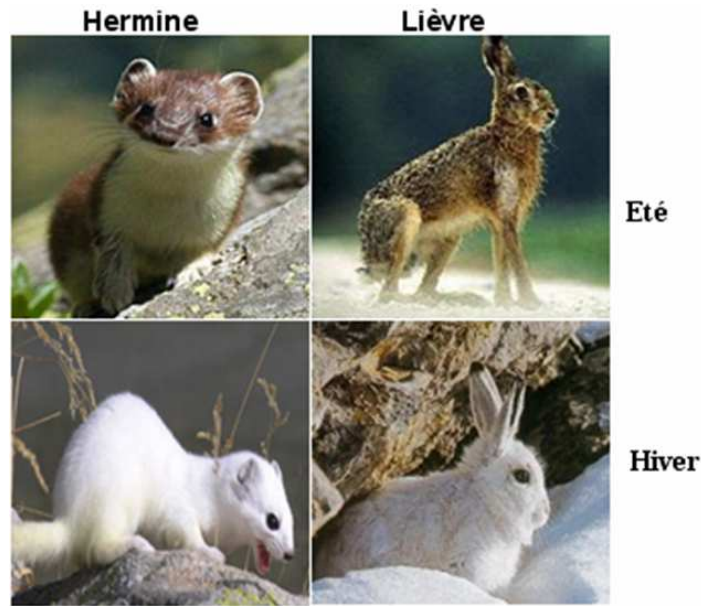


Figure 2 : Changement saisonnier de la coloration du pelage.

Chez l’Hermine (RusT, 1962), le remplacement du pelage, induit par le photopériodisme, était d’autant plus rapide que le changement de température était plus brutal.

L’interprétation de la couleur en terme de menace et/ou d’avertissement semble avoir un sens pour les masques pigmentés de façon précise, sur la tête de mammifères dépourvus d’armes de défense : tâches noires foncées sur la lèvre de certains cervidés qui auraient la signification d’un renforcement de la canine qui existait chez leurs ancêtres; tâches blanches prolongeant les canines (Phacochère, Chevrotain) ou tâches blanches et noires sur les oreilles et la face exagérant les dimensions des cornes (Antilopes, Cervidés). D’ailleurs, le noir a, par rapport aux couleurs claires, une signification de menace : mâle plus foncé que les femelles (même chez l’homme). Les signes d’avertissement préviennent quant à eux de l’existence d’un danger réel : on interprète de cette façon l’inversion de la couleur du pelage du Sconce, blanc sur le dos, foncé sur le ventre (**figure 3**), qui avertit de la puanteur de son propriétaire. On peut citer aussi l’avant du corps



Figure 3 : Couleur du pelage du Sconce.

foncé (Bovins, Cervidés) qui serait un signe d'attaque, de menace, tandis que l'arrière du corps plus clair signifie la soumission lorsque l'animal se tourne. L'arrière blanc des cervidés est considéré comme un signal de ralliement dans la fuite. Comme autres fonctions visuelles de la pigmentation, on peut citer les tâches des félins les confondant avec les tâches de la lumière dans le feuillage, les rayures des zèbres dissimulant les mouvements dans la fuite.

Chez les mammifères, la pigmentation folliculaire, due uniquement à la mélanine, assure la coloration du pelage. Ce pelage, dont la composition et la structure sont strictement définies est un véritable organe de protection contre les chocs et les variations de température. Il se renouvelle non seulement pour maintenir son intégralité, mais aussi pour s'adapter aux changements saisonniers du milieu. Dans ce cas la peau sous-jacente, efficacement protégée, ne possède que peu ou pas de mélanine. Par contre, lorsque la peau est peu couverte de poils ou dénudée, comme c'est le cas notamment chez l'homme, elle est plus ou moins chargée de mélanine et joue un rôle protecteur contre les UVs solaires. Chez l'homme, il existe une corrélation entre la fréquence du cancer de la peau et la couleur de sa peau, selon l'intensité de l'insolation de la région habitée. Chez les mammifères nus ou peu pourvus de poils des régions tropicales (Buffles, Rhinocéros...), la peau est généralement pigmentée, alors qu'elle ne l'est qu'exceptionnellement chez les mammifères à pelage épais et subissant des mues saisonnières.

L'essentiel de la pigmentation de la peau, des poils et des yeux résulte des variations quantitatives et qualitatives du pigment : la mélanine (eumélanine et pheomélanine). Cette mélanine est produite par des cellules spécialisées appelées mélanocytes au sein d'organelles appelés mélanosomes. Ces derniers sont transférés obligatoirement par l'intermédiaire des dendrites du mélanocyte aux kératinocytes avoisinants pour une pigmentation de la peau et/ou des poils. Par contre, dans d'autres tissus, comme l'iris, la couleur des yeux est assurée par les mélanocytes qui seuls contiennent la mélanine. Quelle que soit leur localisation dans la peau, les mélanocytes dérivent d'une origine embryologique commune sous forme de mélanoblastes à partir de la crête neurale. Les mélanoblastes migrent durant la vie embryonnaire de la crête neurale jusqu'à leurs destinations puis, se multiplient et se différencient en mélanocytes. Ces derniers acquièrent alors la capacité de produire et de transporter les mélanosomes remplis de mélanines vers leurs dendrites et de les distribuer aux kératinocytes adjacents pour assurer la pigmentation de la peau et/ou des poils.

Dans les conditions normales, la population mélanocytaire de la peau des mammifères peut être considérée comme un système bicompartimental (compartiment épidermique et compartiment folliculaire). Les deux systèmes pigmentaires, sont anatomiquement

indépendants. En plus les deux activités pigmentaires sont conceptuellement distinctes. Cette différence morphologique retentit sur la physiologie du système pigmentaire, d'autant plus que le fonctionnement des mélanocytes dépend du programme génétique, mais peut également être modulé par des facteurs internes (facteurs tissulaires, hormones) et externes (ultraviolets...). En plus, l'activité des mélanocytes dans l'épiderme est continue alors que celle des mélanocytes folliculaires est au contraire discontinue, rythmée par le cycle pileux. Ainsi, chez certains mammifères la pigmentation de la peau et des poils peut être différente : des êtres humains blancs possèdent des cheveux noirs et chez le porc, des poils blancs se développent au niveau des peaux noires.

Bien que les deux populations mélanocytaires interagissent d'une manière distincte avec les cellules environnantes les processus basiques impliqués dans la production des mélanines et des organelles (mélanosomes) sont comparables comme d'ailleurs, les facteurs qui régulent la mélanogenèse.

L'acquisition d'une pigmentation suffisante et homogène est un processus complexe, qui n'est possible que si la mélanocytogenèse (développement embryonnaire du système pigmentaire) s'est déroulée correctement et que l'ensemble des éléments impliqués dans le processus de la pigmentation (mélanogenèse, biogenèse et transport des mélanosomes, et finalement transfert des mélanosomes aux kératinocytes) est fonctionnel. Ce processus complexe est aujourd'hui assez bien appréhendé, notamment grâce aux travaux réalisés chez les animaux modèles et particulièrement la souris.

Mon sujet de thèse s'inscrit dans ce vaste domaine de la pigmentation chez les mammifères. Il s'intègre dans une thématique de recherche de marqueurs moléculaires spécifiques à chacune des races bovines françaises en exploitant les allèles des gènes de coloration.

Jusqu'alors, mon équipe d'accueil s'est intéressé plutôt à identifier les allèles de gènes de coloration responsables des différents patrons de coloration de la robe bovine. Les données acquises lors de mon travail de thèse constituent une première contribution aux mécanismes moléculaires qui régissent la pigmentation cutanée chez le bovin.

II. EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Le système tégumentaire

La pigmentation cutanée et des poils se déroule au sein du système tégumentaire (tegumentum : couverture) qui regroupe la peau et ses structures annexes les poils, les ongles, des glandes, des muscles et des nerfs. La peau est l'organe le plus exposé aux infections, maladies et lésions. Située à la surface du corps, elle est soumise aux diverses agressions comme les radiations ultraviolettes ainsi qu'aux agressions microbiennes entres autres. De part ces structures annexes, la peau révèle le fonctionnement de certains mécanismes physiologiques normaux comme la pigmentation. Quelque soit sa couleur, elle joue un rôle crucial dans l'estime de soi, ce qui explique que de nombreuses personnes consacrent beaucoup de temps et d'argent à la doter d'une apparence plus normale ou plus jeune !

II.1.1 Structure de la peau

La peau, ou membrane cutanée, recouvre la surface externe du corps. Son épaisseur varie de 0,5 mm sur les paupières à 4 mm sur les talons; elle est de 1 à 2 mm sur la majeure partie du corps. Sur le plan structural, la peau comprend deux parties principales (**figure 4**).

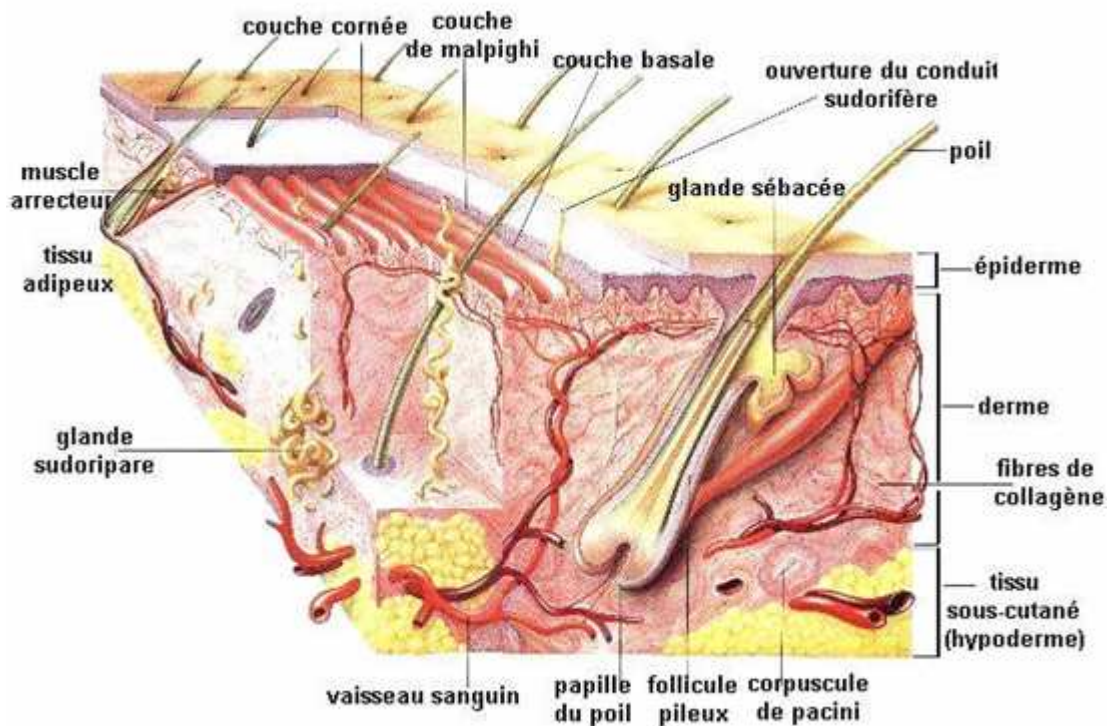


Figure 4 : Histologie de la peau.

La partie superficielle, la plus mince, appelée épiderme (*epi* : sur), se compose d'un *tissu épithélial*. La partie la plus profonde nommée derme est plus épaisse et, se compose de *tissu conjonctif*. En dessous du derme se trouve la couche sous-cutanée, qui n'appartient pas à la peau proprement dite ; elle est appelée fascia superficiel ou encore hypoderme (*hypo* : au-dessous). Des fibres issues du derme ancrent la peau dans le fascia superficiel, lui-même fixé aux tissus et organes sous-jacents. Le fascia superficiel sert de réserve au tissu adipeux et contient de gros vaisseaux sanguins qui irriguent la peau. Cette couche (et, dans certains cas, le derme) renferme aussi des terminaisons nerveuses, les corpuscules lamelleux, ou corpuscules de Pacini, qui sont sensibles à la pression (**figure 4**).

II.1.1.1 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié kératinisé. Les quatre principaux types de cellules qui le composent sont les kératinocytes, les mélanocytes, les macrophagocytes intraépidermiques (cellules de Langerhans) et les cellules de Merkel. Les kératinocytes (*keras* : corne; *kytos* : cellule) constituent environ 90% des cellules épidermiques.

L'épiderme se subdivise en plusieurs couches selon le stade de développement des kératinocytes qui les composent (**figure 5**).

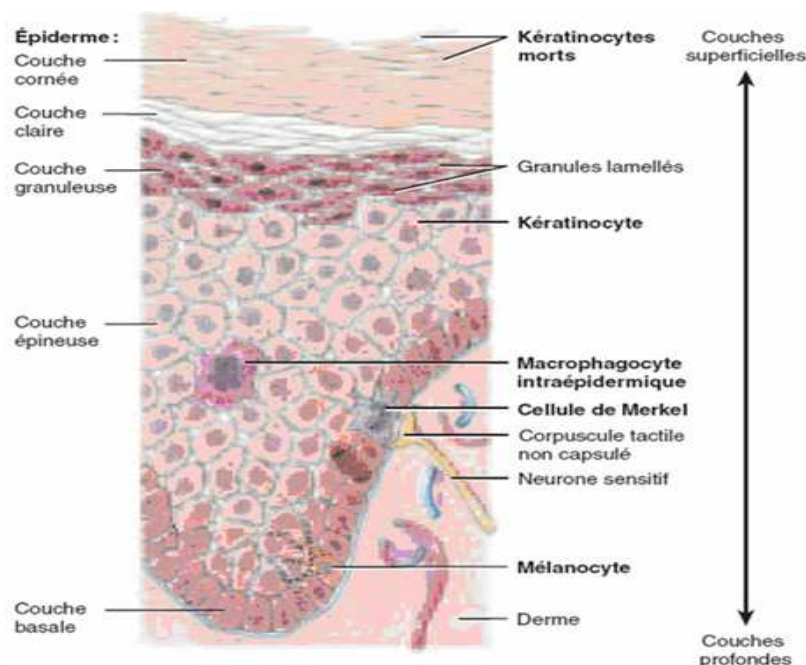


Figure 5 : Différentes couches de l'épiderme.

Dans la plupart des régions du corps humain, l'épiderme compte quatre couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (très mince). Cet épiderme est appelé peau fine. Aux endroits exposés à des frictions intenses, par exemple le bout des doigts, la paume des mains et la plante des pieds, l'épiderme comprend cinq couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (plutôt épaisse). Cet épiderme est appelé peau épaisse.

II.1.1.1.1 La couche basale

La couche basale, ou *stratum basale*, est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle se compose d'une seule strate (épaisseur) de kératinocytes. Certaines de ces cellules sont des *cellules souches* qui se divisent pour produire continuellement de nouveaux kératinocytes. Aussi la couche basale est-elle parfois appelée couche germinative, ou *stratum germinativum*. Les mélanocytes, les macrophagocytes intraépidermiques et les cellules de Merkel sont disséminés parmi les kératinocytes de la couche basale.

II.1.1.1.2 La couche épineuse

La couche épineuse, ou *stratum spinosum*, est située au-dessus de la couche basale; elle compte de 8 à 10 strates de gros kératinocytes polyédriques (à plusieurs facettes) serrés les uns contre les autres. Ces kératinocytes possèdent les mêmes organites que les cellules de la couche basale. La couche épineuse contient aussi entre autres des prolongements de mélanocytes.

II.1.1.1.3 La couche granuleuse

La couche granuleuse, ou *stratum granulosum*, se situe plus ou moins au milieu de l'épiderme. Elle est formée de trois à cinq strates de kératinocytes aplatis en apoptose.

II.1.1.1.4 La couche claire

La couche claire, ou *stratum lucidum*, n'est présente que dans la peau épaisse du bout des doigts, de la paume des mains et de la plante des pieds. Elle est formée de trois à cinq strates de kératinocytes morts, transparents et aplatis qui contiennent de grandes quantités de kératine et des membranes plasmiques épaissies.

II.1.1.1.5 La couche cornée

La couche cornée, ou *stratum corneum*, est formée de 25 à 30 strates de kératinocytes morts et aplatis. Ces cellules sont éliminées continuellement et remplacées à mesure par des cellules des couches plus profondes.

II.1.1.2 Les cellules pigmentaires de la peau

Les mélanocytes (*melas* : noir) constituent environ 8 % des cellules épidermiques. Ils se forment à partir de l'ectoderme embryonnaire et élaborent la mélanine à l'intérieur des mélanosomes. Ces derniers sont transportés le long des dendrites et transférés aux kératinocytes qui permettent alors la pigmentation de la peau.

Tous les individus, sans distinction de phototype, ont approximativement le même nombre de mélanocytes pour une zone cutanée donnée. Les différences ethniques, en terme de pigmentation, ne sont pas dues au nombre de mélanocytes, mais à l'activité mélanogénique effective de leurs mélanosomes. Chacun des mélanocytes épidermiques établit des contacts via ses dendrites avec environ 36 kératinocytes auxquels il transfère sa production de pigments. Ces derniers colorent la peau et absorbent les rayonnements ultraviolets (UVs) nocifs. Ils constituent ainsi, une protection naturelle et efficace contre les effets délétères des rayonnements ultraviolets (cancers) et contre le photo-vieillissement cutané en général. Les personnes qui possèdent une peau sombre développent beaucoup moins de cancers cutanés que les personnes qui possèdent une peau pâle.

II.1.1.3 Annexes cutanées

Les annexes cutanées, structures réparties dans le derme et l'épiderme, interviennent dans le maintien de l'homéostasie de la peau. Ces structures sont les poils, les ongles, et deux types de glandes exocrines, les glandes sudoripares et sébacées (Marieb, 1993). Nous parlerons uniquement des poils.

II.1.1.3.1 Follicules pileux

Bien que ces tout petits organes ne soient responsables d'aucune fonction vitale chez l'homme, les poils confèrent plusieurs fonctions importantes aux mammifères comme le maintien de la température corporelle et fournir des sensations tactiles (Ebling, 1987).

A. Structure des follicules pileux

Le poil, structure produite par le follicule pileux est constitué de cellules kératinisées. Il est implanté obliquement dans le derme par invagination de l'épiderme (Marieb, 1993).

Les principales parties du poil sont la tige, partie visible à la surface du tégument, et la racine, partie invisible enchâssée dans le derme dont l'extrémité en cupule (le bulbe pileux) reçoit la papille vasculaire nourricière (papille dermique) (Marieb, 1993). Le bulbe pileux est entouré d'un enchevêtrement de terminaisons nerveuses sensibles s'enroulant autour de chaque follicule et appelées plexus de la racine du poil (Marieb, 1993). Les poils sont donc également des récepteurs sensoriels du toucher. La papille dermique est quant à elle composée de tissu dermique et est vascularisée par des capillaires qui apportent aux cellules du follicule pileux les nutriments essentiels à sa croissance (Marieb, 1993). Le poil comporte aussi des annexes : une glande sébacée, l'ensemble formant l'unité pilo-sébacée, et le muscle arrecteur, dont la contraction, sous l'influence du froid ou d'une émotion, est à l'origine du phénomène de la « chair de poule ».

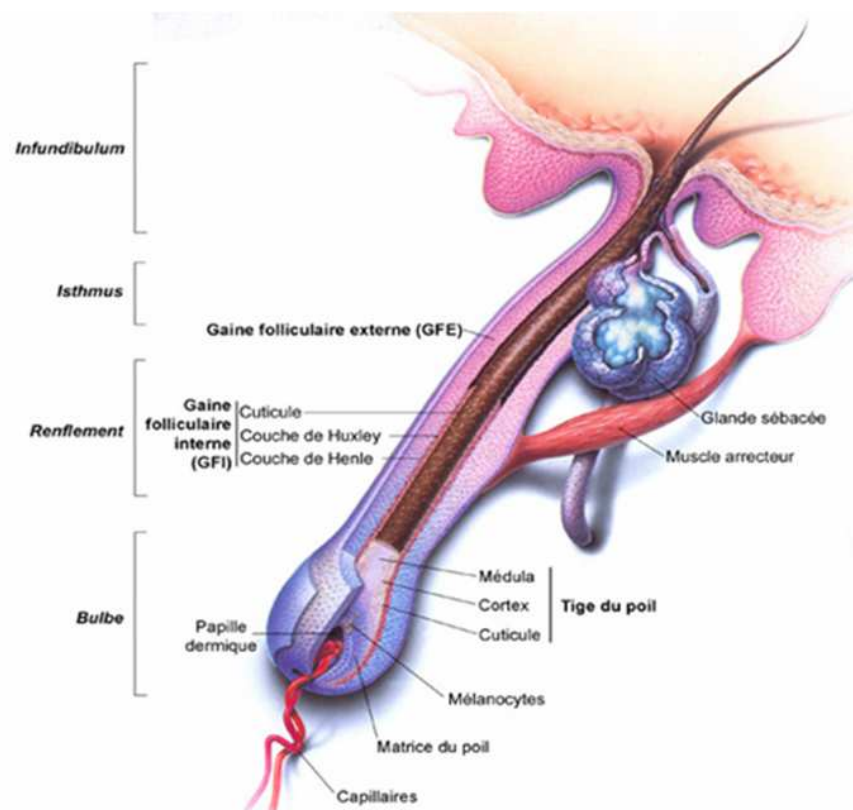


Figure 6 : Structure du poil.

Le follicule pileux et la glande sébacée forment l'appareil pilo-sébacé (Geras 1990).

Observée en coupe longitudinale, l'unité pilo-sébacée du follicule se divise en plusieurs compartiments : l'*infundibulum* (portion superficielle au-dessus du conduit de la glande sébacée en continuité avec l'épiderme interfolliculaire), l'*isthmus* (courte portion entre

le conduit de la glande sébacée et la protubérance du muscle arrecteur), le renflement où s'attache le muscle arrecteur du poil, et le segment inférieur se terminant par le bulbe pileux (**figure 6**) (Luelmo-Aguilar et Santandreu, 2004; Moll, 1994).

B. Croissance des poils

Le follicule passe par plusieurs cycles de croissance au cours desquels chaque poil subit trois phases successives (**figure 7**).

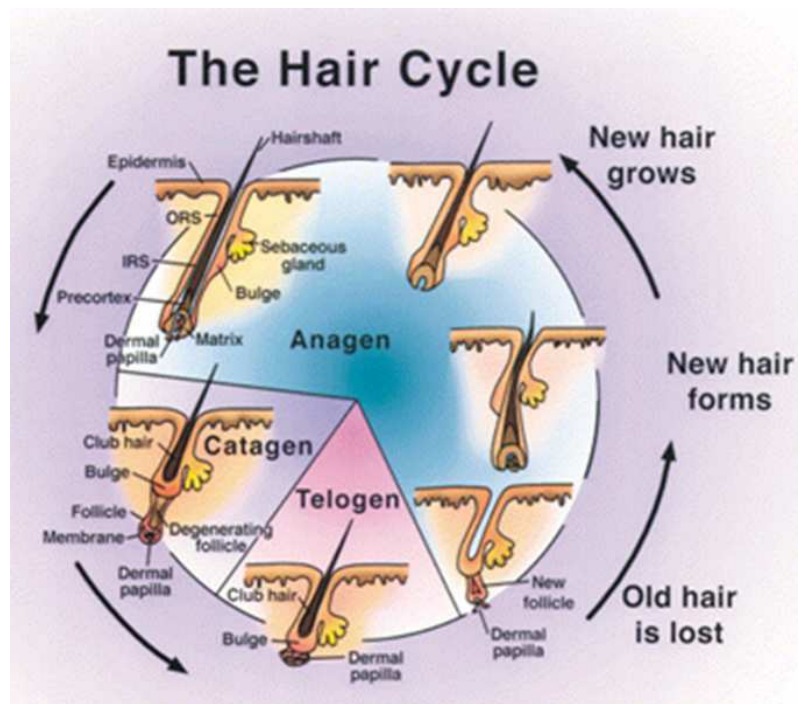


Figure 7 : Le cycle du poil.

La croissance du poil est cyclique et se déroule en trois phases : anagène (croissance), catagène (régression) et télogène (repos) (Fuchs, 2001).

Lors de ces cycles de croissance, c'est la portion inférieure du follicule pileux qui subit le plus de transformations. Il y a d'abord la phase anagène qui est la phase de croissance au cours de laquelle le poil croît de façon continue et qui est caractérisée par une intense activité mitotique dans le bulbe vascularisé (Stenn et Paus, 2001). Les cellules de la matrice prolifèrent et se différencient donc pour former la gaine folliculaire interne (GFI) et la tige du poil. La vitesse de croissance du poil est d'environ 0,25 à 0,50 mm/jour ; elle varie en fonction de nombreux facteurs, mais diffère peu d'une région à l'autre du corps. En revanche, la durée de la phase de croissance, facteur déterminant la longueur moyenne des poils dans

une zone déterminée, est très variable selon la région du corps. La phase de croissance active est suivie d'une phase de transition qui dure environ deux semaines durant lesquelles les mitoses s'arrêtent brutalement : c'est la phase catagène (Stenn et Paus, 2001). Pendant cette phase, les deux tiers inférieurs du poil entrent en mort cellulaire programmée; il y a alors régression et raccourcissement du poil (Fuchs et al., 2001; Stenn et Paus, 2001; Weedon et Strutton, 1981). La phase de repos, période pendant laquelle la matrice est inactive et le follicule s'atrophie, est appelée phase télogène et elle dure environ trois mois (Stenn et Paus, 2001). Après la phase de repos, la matrice se réactive et forme un nouveau poil qui remplacera celui qui est tombé ou qui le délogera s'il est encore présent. Au moment où le poil entre dans un nouveau cycle de croissance, les cellules souches épithéliales du follicule sont stimulées afin qu'elles se divisent grâce à un signal provenant de la papille dermique (Fuchs et al., 2001).

C. Développement des follicules pileux

L'initiation du développement des follicules pileux chez les mammifères est contrôlée par une série d'interactions réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme (**figure 8**) (Hardy, 1992; Millar, 2002).

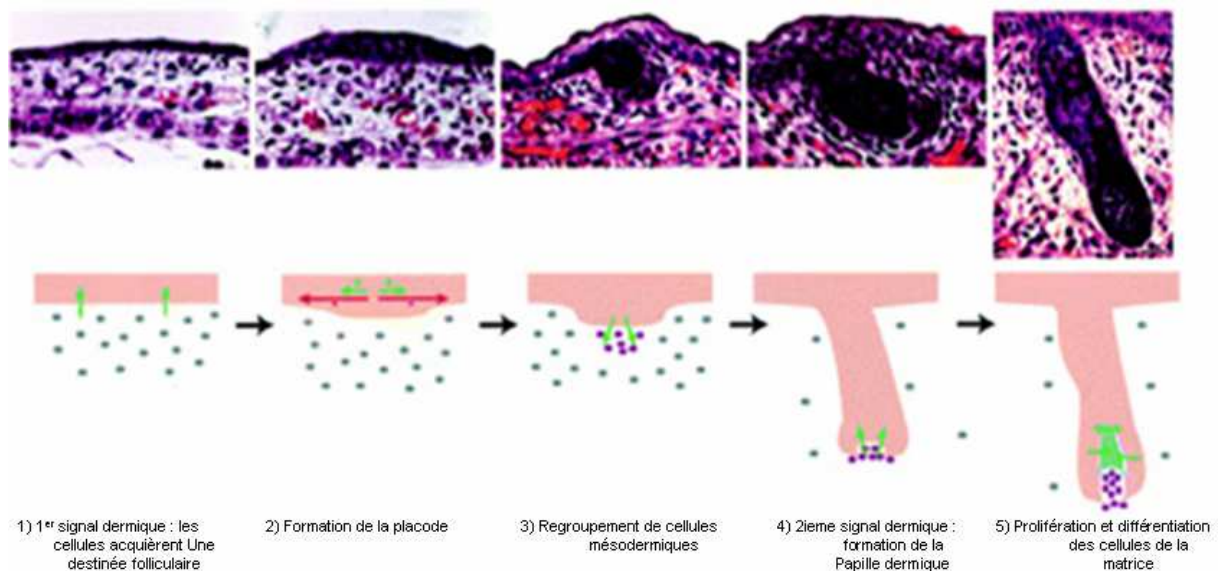


Figure 8 : La morphogenèse du poil.
Séquence d'événements menant à la formation des follicules pileux (Millar, 2002).

Le premier signe visible de la formation des poils est la présence d'une placode. Celle-ci est formée à la suite d'un épaissement de l'ectoderme embryonnaire induit par ce qu'on appelle le « premier signal » provenant du mésenchyme sous-jacent (Hardy, 1992; Millar, 2002). La formation de la placode implique un changement au niveau de la forme des cellules épithéliales qui deviennent alors plus allongées que les cellules adjacentes ne faisant pas partie de la placode. Un signal provenant de la placode provoque par la suite une condensation des cellules du mésenchyme. Ensuite, ce qu'on appelle « le deuxième signal » qui provient du mésoderme induit quant à lui la prolifération des cellules épithéliales de la placode qui vont alors croître vers l'intérieur du mésenchyme, formant ainsi la matrice germinale qui est à l'origine même du poil (Millar, 2002). En effet, en proliférant, les cellules de la matrice repoussent les cellules superficielles soit vers l'extérieur, soit dans la dépression produite par l'invagination tubulaire de l'épiderme qui s'enfonce dans le derme. Cette invagination épidermique, constituant la gaine épithéliale du poil, se renfle à son extrémité profonde et constitue là un amas de cellules matricielles coiffant une papille de tissu conjonctif vascularisé. Cette papille dermique est formée par les cellules épithéliales qui entourent le condensé de cellules mésodermiques et elle représente une structure permanente à la base des follicules qui contrôle la croissance et la différenciation des poils (Millar, 2002). Une fois la structure primaire du poil établie, la différenciation des couches concentriques de kératinocytes peut commencer (Kulesa et al., 2000). En effet, les cellules épithéliales contenues dans la matrice du poil recouvrent la papille, se divisent par mitose et donnent des cellules qui se remplissent de kératines et qui permettent l'allongement du poil grâce à l'addition à sa base d'autres cellules qui vont elles aussi se kératiniser. Ce sont des signaux chimiques en provenance de la papille dermique qui stimulent la division des cellules épithéliales de la matrice. Au fur et à mesure que la matrice produit de nouvelles cellules, la partie la plus ancienne du poil est poussée vers le haut ; ces cellules deviennent de plus en plus kératinisées et meurent.

La couche en périphérie forme ainsi la gaine folliculaire externe (GFE) qui est en continuité avec la couche basale de l'épiderme (Fuchs et al., 2001; Kulesa et al., 2000). A l'intérieur même du poil, deux autres couches se développent à partir des cellules de la matrice entourant la papille dermique, soit la gaine folliculaire interne (couche de Henley, couche de Huxley et cuticule de la gaine) et la tige du poil qui se compose presque totalement de kératines dures (Fuchs et al., 2001; Kulesa et al., 2000). Les cellules épithéliales finissent par arrêter de se diviser et elles se différencient selon leur emplacement dans le follicule (Botchkarev, 2003). Les cellules proches de la GFE forment la GFI alors que les cellules

localisées au centre donnent la tige du poil qui se compose de la médulle au centre, du cortex et de la cuticule vers l'extérieur (Botchkarev, 2003; Kulesa et al., 2000).

Durant le développement des follicules pileux, les mélanocytes provenant de la crête neurale migrent vers ce dernier et se différencient pour produire la mélanine. Ce pigment est ensuite transmis des mélanocytes aux kératinocytes de la tige du poil, ce qui détermine la couleur du poil (Botchkarev, 2003).

II.1.1.4 Particularités de la peau murine

Bien que les types de peau chez les mammifères soient assez semblables au niveau histologique, il existe de nombreuses distinctions.

La différence majeure par rapport à l'homme, est évidemment la grande densité de follicules pileux qui recouvrent la souris. L'épiderme interfolliculaire est en effet pratiquement inexistant. De plus, les souris possèdent certains types de poils qu'on ne retrouve pas chez l'homme, comme par exemple les vibrisses. Les poils murins ont également un cycle de vie différent de celui des humains. En effet, la plupart des follicules pileux murins adultes demeurent dans la phase télogène pour de longues périodes, ce qui explique le fait que la longueur des poils est constante chez les souris adultes alors que chez les humains, les poils poussent continuellement. L'épiderme murin est aussi très mince et ne possède que quelques couches de cellules vivantes, soient 2 à 3 couches, comparativement aux 10 à 15 chez l'humain. Les souris sont également dépourvues de glandes apocrines (Sundberg et King, 1996). Les dômes tactiles contenant les cellules de Merkel sont toutefois beaucoup plus nombreux chez les souris que chez les humains et leur distribution est aussi différente. En effet, contrairement à ce qui est retrouvé dans la peau humaine, les cellules de Merkel sont toujours absentes de l'épithélium des poils de souris (Moll, 1996). On les retrouve plutôt au niveau de la GFE des vibrisses ainsi que dans les coussinets plantaires (Moll, 1996).

Les mutations qui affectent la couleur du pelage chez la souris possèdent une longue histoire en recherche. Elles ont fait de la cellule pigmentaire, le mélanocyte, un système idéal pour des analyses en génétique, en biochimie, en biologie moléculaire et cellulaire. L'analyse moléculaire des différentes mutations a permis d'appréhender l'épistasie et les différentes voies de transductions des signaux qui régissent la définition de la pigmentation chez les mammifères. Qu'elles soient naturelles ou induites, les mutations du pelage chez la souris ont également contribué à l'étude des mécanismes généraux impliqués dans la différenciation des cellules souches, mais aussi à appréhender certaines maladies humaines.

Bien que l'utilisation de la souris comme modèle animal présente plusieurs avantages, il est important de demeurer conscient des nombreuses différences existant entre les différentes espèces. La prudence est mise dans l'interprétation des résultats obtenus chez la souris ; ces derniers ne peuvent pas toujours être extrapolés à toutes les autres espèces de mammifères comme le bovin et l'homme par exemple.

II.2 Le développement des mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires

Chez les Mammifères, l'ensemble de la population des mélanocytes se localise dans les follicules pileux et dans l'assise basale de l'épiderme. Quelle que soit leur localisation dans la peau, les mélanocytes ont une origine embryologique commune, la crête neurale dont elles dérivent sous formes de mélanoblastes (cellules non-pigmentées) dès les premiers stades du développement embryonnaire (**figure 9**).

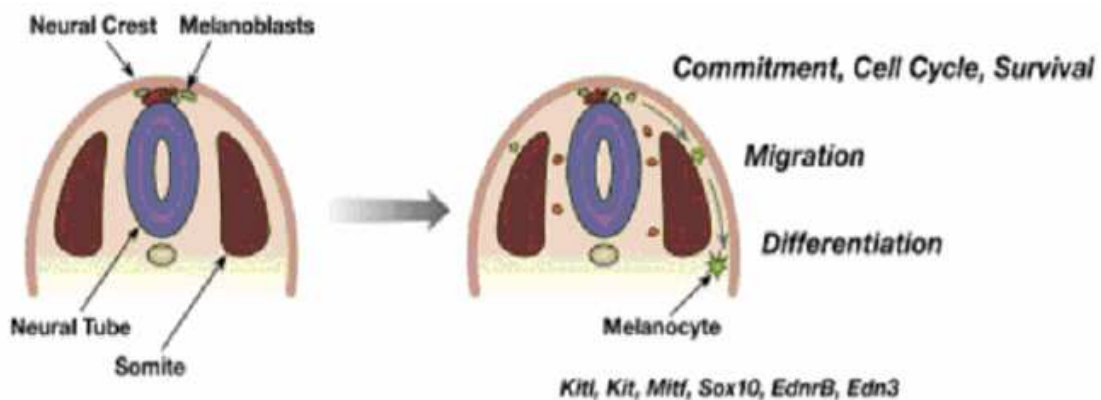


Figure 9 : Développement du mélanocyte.

Quelques gènes impliqués dans ce processus de développement sont indiqués



Figure 10 : Mise en évidence de la migration des Mélanoblastes (en bleu) d'embryon de souris exprimant DCT-LacZ (*Enshell-Seiffers et al., 2008*).

Chez la souris, on a pu suivre le développement des mélanoblastes en utilisant (**figure 10**) des embryons de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur de *Dct* (un gène spécifique de la lignée mélanocytaire).

Les mélanoblastes murins entament leur migration selon l'axe dorso-latéral entre le dermatome et l'ectoderme autour de E8.5 (8.5^{ème} jour du développement embryonnaire). À partir d'E14.5, ils commencent à envahir l'épiderme et éventuellement les follicules pileux qui sont en cours de développement. Il a été également bien établi que les mélanocytes tégumentaires des mammifères ont pour origine plusieurs clones mélanoblastiques (Enshell-Seijffers et al., 2008; Jordan et Jackson, 2000; Mayer, 1973). Chez l'homme, la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes (acquisition du caractère dendritique, synthèse de pigments) se produit entre la 8^{ème} et la 14^{ème} semaine de la vie intra-utérine.

Après une migration qui s'effectue selon un axe dorsoventral et craniocaudal, les mélanoblastes atteignent leur territoire définitif, c'est-à-dire l'assise basale de l'épiderme et les follicules pileux. Il est à noter que les mélanocytes colonisent l'épiderme avant la différenciation des poils. Au stade initial de l'apparition des poils, les mélanocytes se répartissent au hasard sans localisation privilégiée dans l'ébauche pileuse. Ce n'est qu'après le sixième mois de la vie intra-utérine, que les mélanocytes se localiseront à l'infundibulum (assise périphérique de la gaine épithéliale externe) et au sommet de la papille dermique dans le bulbe pileux (Mishima et Widlan, 1966). Ainsi, pendant la vie embryonnaire, ce sont les mélanocytes épidermiques qui sont à l'origine de la pigmentation des poils. Ce phénomène n'implique pas cependant un mouvement des mélanocytes car ceux-ci sont incorporés passivement aux ébauches pileuses qui se différencient à partir de l'épiderme. Chez l'adulte, les mélanocytes épidermiques ne semblent pas capables de coloniser les follicules pileux (Chase et Rauch, 1950; Taylor, 1949).

Au cours de la vie, la population mélanocytaire de l'épiderme est relativement constante, bien que décroissant progressivement avec l'âge. En l'absence de toute stimulation externe, il est exceptionnel d'observer des images de mitoses mélanocytaires dans l'épiderme.

Cependant, plusieurs arguments expérimentaux montrent que la population mélanocytaire de l'épiderme constitue un système dynamique dont le taux de renouvellement est faible mais continu. Par contre, la stimulation par les ultraviolets augmente beaucoup le nombre de mitoses mélanocytaires (Rosdahl, 1979). Par ailleurs, l'activité des mélanocytes dans l'épiderme est continue. Elle détermine la pigmentation constitutive de l'individu

considéré. L'intervention de stimuli internes ou externes détermine l'acquisition d'une pigmentation facultative.

Dans les follicules pileux, la population des mélanocytes bulbaires est renouvelée à chaque cycle. Par conséquent, l'activité des mélanocytes folliculaires est discontinue, rythmée par le cycle pileux. Ceux-ci ne synthétisent activement du pigment que pendant une phase très courte du cycle pileux, à savoir de l'anagène III à l'anagène VI. Pendant les phases catagène et télogène, certains mélanocytes prolifèrent, se différencient et repeuplent le bulbe durant le début du stade catagène.

L'existence d'un réservoir de mélanocytes dans les follicules pileux des mammifères a été proposée (Sugiyama et Kukita, 1976). Aujourd'hui, différents travaux ont reporté des évidences de l'existence d'un tel réservoir de cellules mélanocytaires qui renouvelle les mélanocytes à chaque cycle pileux. Ce sont des cellules souches situées au niveau d'une structure, le bulge, au niveau du poil (**figure 11**). En effet lors du développement embryonnaire, une fois au niveau du follicule pileux, les mélanoblastes se scindent en deux populations (**figure 11**) : les mélanocytes différenciés qui colonisent la matrice du poil et qui

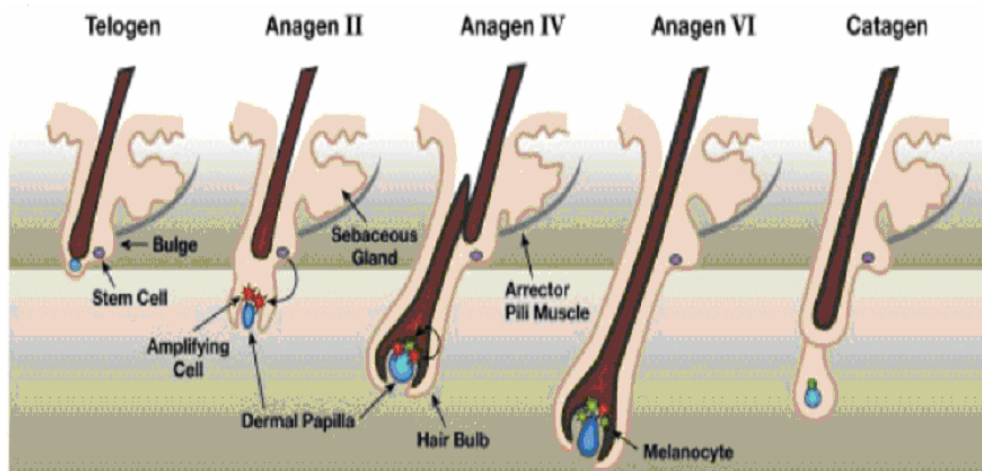


Figure 11 : Différentes phases du développement du poil.

entament la synthèse des mélanines 4 jours environ après la naissance (chez la souris) et, les mélanocytes qui se retrouvent dans le bulge du follicule pileux et qui permettent de régénérer les mélanocytes à chaque cycle pileux (Nishimura et al., 2002). Ainsi, les premiers mélanocytes qui produisent les pigments destinés à la pigmentation du poil ont une origine directe des mélanoblastes et ne passent pas par le stade des cellules souches mélanocytaires (Mak et al., 2006).

Chez la souris, les lignées porteuses de mutations qui affectent des gènes essentiels pour le développement (*Mitf*, *Ednrb*, *Kit*, *Kitl*, *Edn3*, *Pax3*, *Sox10*) correct des mélanocytes, présentent des taches blanches (white-spotting ou piebald).

Mitf (Microphthalmia-associated Transcription Factor) est l'un des gènes majeurs dont certains allèles provoquant le phénotype pie (piebald). C'est un facteur de transcription clé pour plusieurs gènes spécifiques du mélanocyte. Il régule l'expression des gènes de la famille *tyrosinase* codant les enzymes de la mélanogenèse (Tyr, Tyrp1, Dct) (Yasumoto et al., 1997) mais également l'expression de gènes dont les produits sont 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). Les allèles de certains gènes comme *Pax3* et *SOX10* dont dépend l'expression de *Mitf* lui-même, induisent également un phénotype pie (Epstein et al., 1993; Potterf et al., 2000).

Tous ces mutants et bien d'autres de ce type (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.

La distribution des mélanocytes entre l'épiderme et les follicules des poils varie entre les espèces. Certains animaux à fourrure comme la souris, ne possèdent pas de mélanocytes épidermiques à l'exception de certaines régions dénudées, au niveau de l'oreille et du nez. D'autres comme l'ours blanc présente une forte densité de mélanocytes épidermiques qui lui confère une pigmentation noire de la peau (**figure 12**).



Figure 12 : Pelage agouti d'une souris sauvage et celui de l'ours blanc. La flèche indique une pigmentation noire de la peau de l'ours blanc.

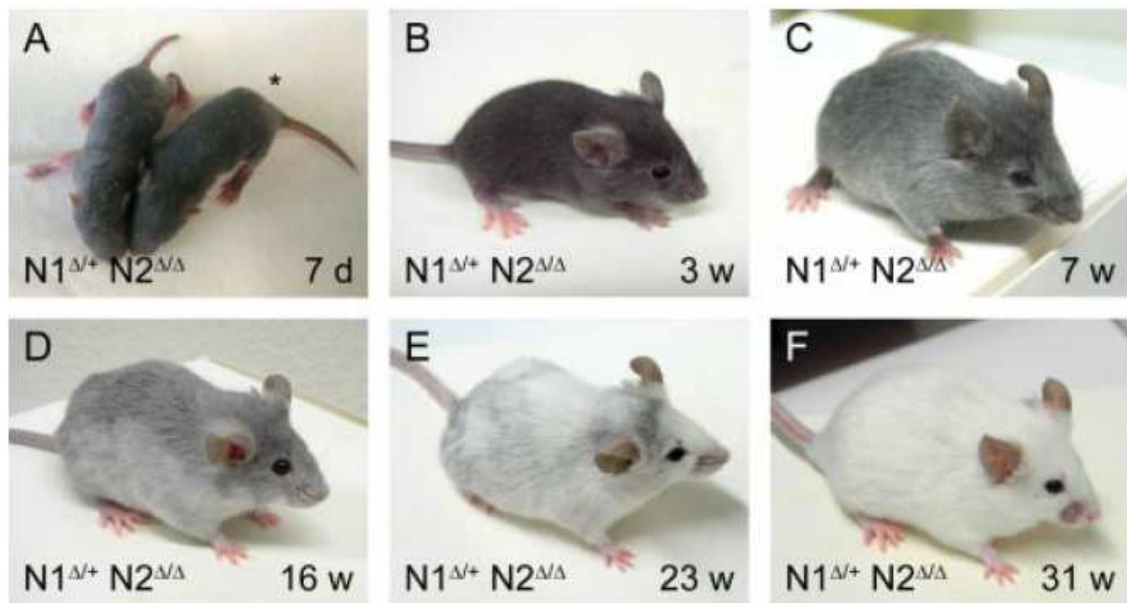


Figure 13 : Les images illustrent l'importance des voies Notch dans le renouvellement des mélanocytes à partir des cellules souches au niveau de bulge. A : L'animal naît avec une pigmentation normale (le sauvage est marqué par une étoile). A partir de 3 semaines, le pelage gris de la souris invalidé spécifiquement au niveau des lignées mélanocytaires pour *Notch1* (un seul allèle) et *Notch2* (les deux allèles) devient évident. Au bout de 31 semaines, la souris devient entièrement blanche (Schouwey et al., 2007).

Le cycle de vie d'un mélanocyte constitue un modèle attractif pour l'étude des bases moléculaires de l'établissement d'un type cellulaire incluant son développement, sa prolifération, sa survie pour atteindre sa destinée et enfin sa différenciation. Dans le cas du mélanocyte, plusieurs gènes ont été identifiés en exploitant l'apparition de mutations, souvent spontanées, qui affectent la couleur du pelage. Ces mutations affectent différents processus au cours du cycle de vie du mélanocyte. On peut citer à titre d'exemple, l'initiation de leur développement, leur maintenance, leur migration, leur régénération ainsi que la différenciation et enfin la synthèse des pigments.

La nature et les effets de ces mutations et bien d'autres ont été décrites dans différentes revues (Bennett et Lamoreux, 2003; Tomita et Suzuki, 2004). Par ailleurs, un site Web (<http://www.espcr.org/micemut/>) dédié à l'ensemble des gènes de colorations (de fonctions connues ou pas) maintient à jour les informations les plus récentes dans le domaine de la pigmentation chez la souris et l'homme. Les gènes y sont classés selon leurs effets sur les mélanocytes.

En plus de leurs rôles dans le développement du mélanoblaste/mélanocyte, *Mitf*, *Pax3*, et *Sox10* sont essentiels dans la maintenance des cellules souches mélanocytaires (mélanocyte stem cell : MSCs) au niveau du follicule pileux. L'expression de *Mitf* dans les MSCs est nécessaire pour la régulation du gène *Bcl2* pour garantir leur survie (Nishimura et al., 2005). *Pax3* est également exprimé dans les MSCs pour maintenir l'expression de *Mitf*. Simultanément, *Pax3* réprime l'activation des gènes de la mélanogenèse initiée par l'interaction *Mitf/Sox10*, ce qui expliquerait en partie la non pigmentation des cellules MSCs par rapport aux cellules mélanocytaires au niveau de la matrice des poils (Steingrimsdottir et al., 2006).

Un travail publié récemment (Schouwey et al., 2007) souligne également l'importance des voies de transduction de *Notch* (*Notch1* et *Notch2*) dans le renouvellement des mélanocytes à chaque cycle pileux. Les auteurs de ce travail ont pu montrer en utilisant des souris invalidées de façon conditionnelle pour les gènes *Notch1* et *Notch2*, que les animaux deviennent gris en fonction de l'âge, avec une coloration tout à fait normale à la naissance. Le non renouvellement des cellules mélanocytaires à partir des MSCs du bulge est dose-dépendant de la voie *Notch1/Notch2* (**figure 13**). Les voies de transduction *Notch1/Notch2* n'affectent que la pigmentation des poils. En effet les rares zones pigmentées de la peau ne sont pas affectées (Schouwey et al., 2007).

II.3 Biogenèse du Mélanosome

Le concept original de la biogenèse du mélanosome a été proposé depuis une quarantaine d'années par Seiji et Iwashita (1963).

Le mélanosome, une sous classe de lysosome sécrétoire, est l'organe 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). Au moins 20 mutations affectant le développement du mélanosome sont connues. Ils engendrent souvent une coloration diluée du pelage. Les allèles sauvages de ces mutations codent pour des constituants complexes qui sont nécessaires pour la formation de divers organelles incluant le mélanosome (Wei, 2006).

La biogenèse des mélanosomes se déroule en quatre étapes séquentielles (**figure 14**).

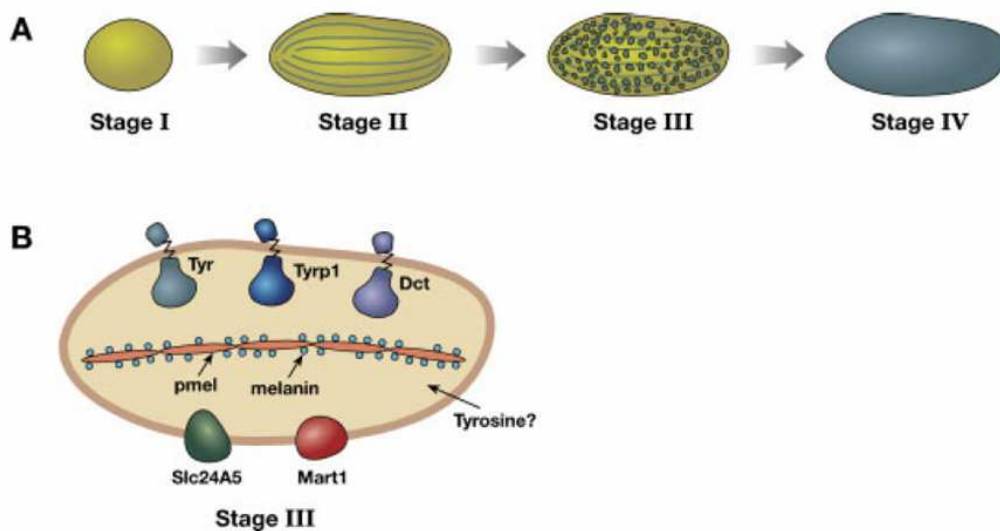


Figure 14 : Développement du mélanosome.

A: Les quatre stades du développement du mélanosome sont indiqués. Le stade II se caractérise par une striation de la matrice mélanosomale.

B: Les mélanosomes au stade III contiennent les enzymes de la famille tyrosinase impliquées directement dans la synthèse des mélanines à partir de la tyrosine. (Steingrimsson et al., 2006).

Au stade I, les mélanosomes 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'organe (Yasumoto et al., 2004). Dans les cellules

pigmentées, les mélanines produites par les enzymes de la famille tyrosinase sont déposées sur ces fibres, ce qui constitue le mélanosome de type III. 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. Une autre protéine, Mart-1, aussi connue sous le nom de Melan-A, localisée dans les mélanosomes de stades I et/ou II (Hoashi et al., 2005) participe à l'élaboration de la structure du mélanosome du fait qu'elle est indispensable pour l'expression, la stabilité et la maturation de Pmel17 et donc à l'étape critique de la formation du mélanosome de stade II.

Les enzymes qui catalysent la formation des mélanines sont codées par les gènes de la famille *tyrosinase* : *albino* (désigné aussi par, *c*, *tyrosinase* ou *Tyr*), *slaty* (*slt*, *dopachrome tautomerase*, *Dct*), et *brown* (*b*, *tyrosinase-related protein 1*). Ce sont des protéines membranaires du mélanosome, avec une large partie dans la lumière de ce dernier (**figure 15**). La figure 15 présente quelques phénotypes du pelage de lignées affectées dans les gènes de la famille Tyrosinase.

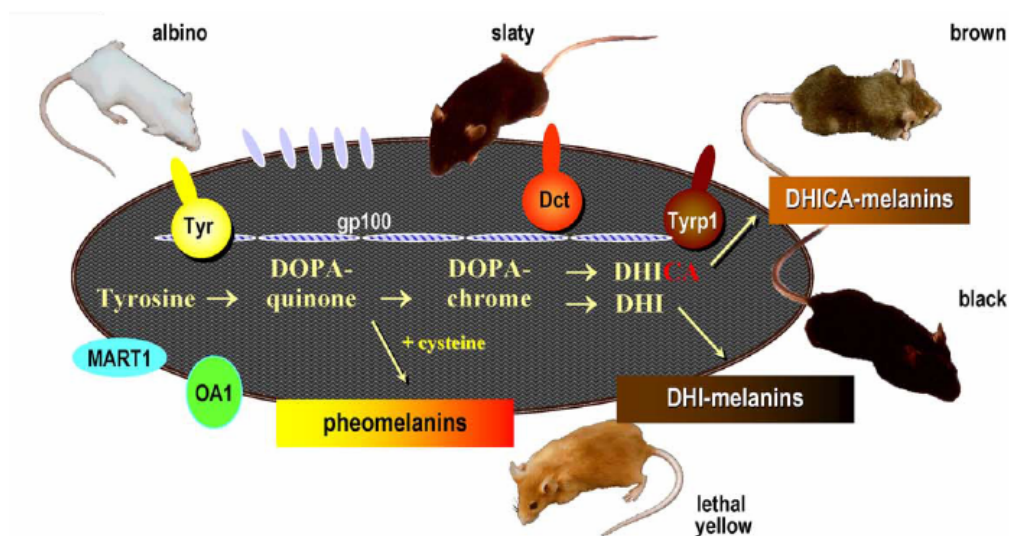


Figure 15 : Quelques phénotypes du pelage de lignées de souris affectées dans les gènes impliqués directement dans la synthèse des pigments au sein du mélanosome : mutation *Tyr* (albino), mutation *Dct* (slaty), *Tyrp1* (brown). Le dernier phénotype jaune illustre la pigmentation pheomélanine chez la souris, mutation gain de fonction du gène *Agouti* (lethal yellow).

En plus de ces protéines impliquées directement dans la synthèse biochimique des mélanines, d'autres protéines transmembranaires du mélanosome influencent la production des pigments. C'est notamment le cas de la protéine P codée par le gène *pink-eyed dilution* et qui est similaire à la pompe échangeuse d'ions Na^+/H^+ d'*Escherichia coli*. Elle serait

impliquée dans la régulation du pH du mélanosome. On peut citer également la protéine Slc24a5 (aussi nommée Matp), une protéine transmembranaire du mélanosome codé par *underwhite* (Newton et al., 2001). P et Slc24a5 sont similaires, les deux possèdent 12 domaines transmembranaires. Des données récentes ont montré que la maturation et le trafic de la tyrosinase sont affectés chez les mutants *slc45a2* suggérant que Slc45a2 est impliqué dans la formation et/ou la maturation du mélanosome (Costin et al., 2003). Lamason et al. (Lamason et al., 2005) ont montré que le locus golden chez zebrafish correspond au gène *Slc45a2*. Ils ont aussi identifié un polymorphisme dans le gène *SLC24A5* humain et qui est associé à une pigmentation claire en particulier chez les européens (Lamason et al., 2005).

La synthèse en soit des mélanines (eumélanine et pheomélanine) dans le mélanosome débute par un précurseur commun, l'acide aminé tyrosine. 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 16**).

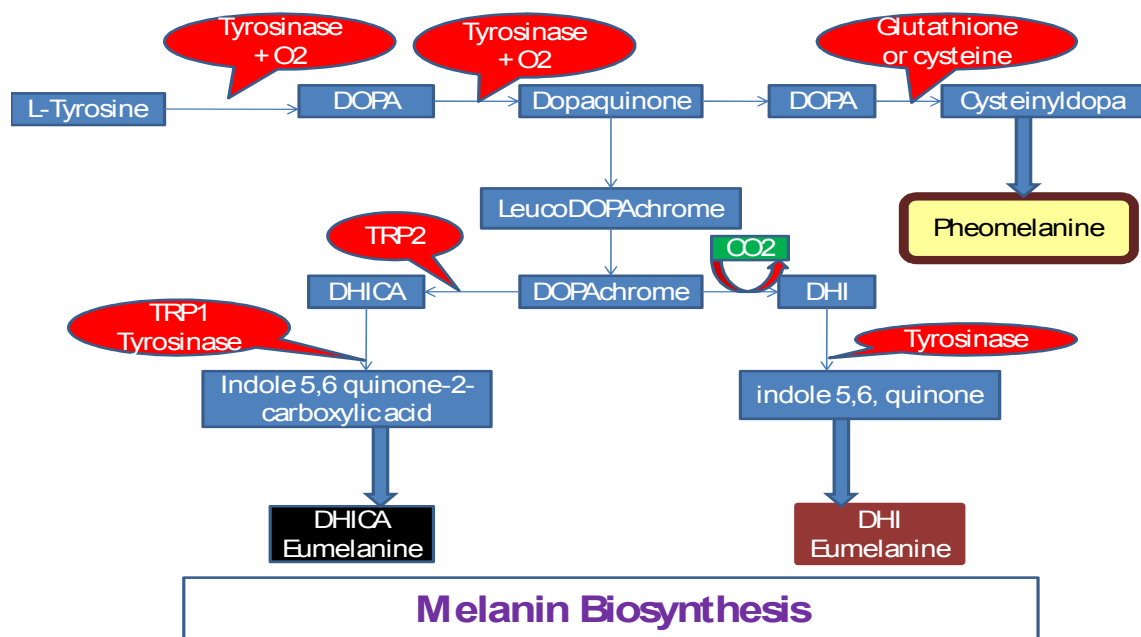


Figure 16 : Biosynthèse des mélanines (Bologna et al., 2003). La tyrosinase intervient dans les deux premières étapes de la synthèse des précurseurs des mélanines, puis les enzymes Dct (Tyrp2) et Tyrp1 coopèrent avec la Tyrosinase pour la production d'eumélanines (noir/brun), ou bien le précurseur DOPAquinone est utilisé pour la production de pheomélanines en présence de cystéines.

La tyrosinase est l'enzyme clé de la mélanogenèse. Elle intervient également en aval pour l'oxydation du 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole-5,6-quinone. L'isomérisation du DOPochrome (indolene-2-carboxylic acid-5,6-quinone) en 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) est catalysée par la DOPochrome 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 DOPochrome, alors que les pheomélanines découlent des métabolites des cysteinylDOPA (**figure 16**).

II.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 keratinocytes. 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 Va* pour la mobilité dans le réseau d'actine (**figure 17**).

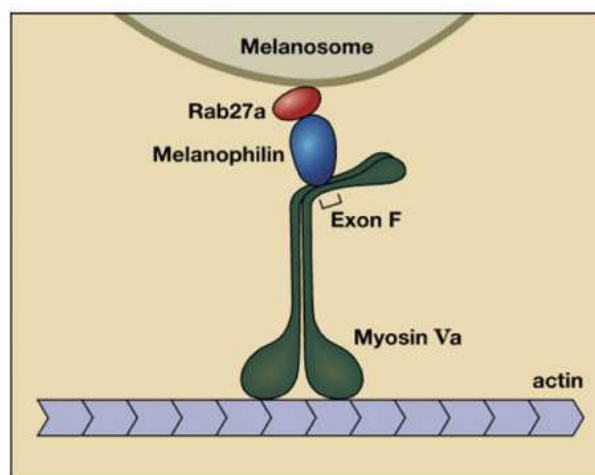


Figure 17 : Transport du mélanosome par le complexe Mélanosome-MyosinVa-Rab27a-Mélanophilin.

Lors de ce transport, Rab27a interagit avec le mélanosome alors que la mélanophiline forme un pont entre Rab27a et la Myosin Va. La région codée par l'exon F de Myosin Va interagit avec la mélanophiline.

La mutation de la *myosin-Va* communément connue *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 Mélanophiline, 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* (*Mélanophilin*) et *ashen* (*Rab27a*) (Bennett et Lamoreux, 2003).

Suite à leur transport vers la périphérie du mélanocyte, les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes environnants soit par phagocytose des extrémités dendritiques, soit via un pore de communication intercellulaire, ou soit par exocytose des mélanines suivie d'une endocytose par les kératinocytes (Yamamoto et Bhawan, 1994).

II.5 Régulation de la pigmentation pileaire

Le pelage de la souris sauvage agouti se caractérise par un ensemble de poils noirs (eumélanine) avec une bandelette jaune sub-terminale (pheomélanine). La coloration globale apparente du pelage est communément désignée par le phénotype agouti (**figure 18**). La régulation permettant la production de cette bande jaune est appelée le «Switch» de la mélanogenèse dans les mélanocytes du follicule pileux. Bien que le mécanisme impliqué dans le Switch entre la synthèse de l'eumélanine et la pheomélanine a été bien élucidé chez la souris, il n'a pas été démontré chez la plupart des mammifères. Ce Switch de la mélanogenèse (**figure 18**) est assuré par le récepteur aux mélanocortines 1 (MC1R).

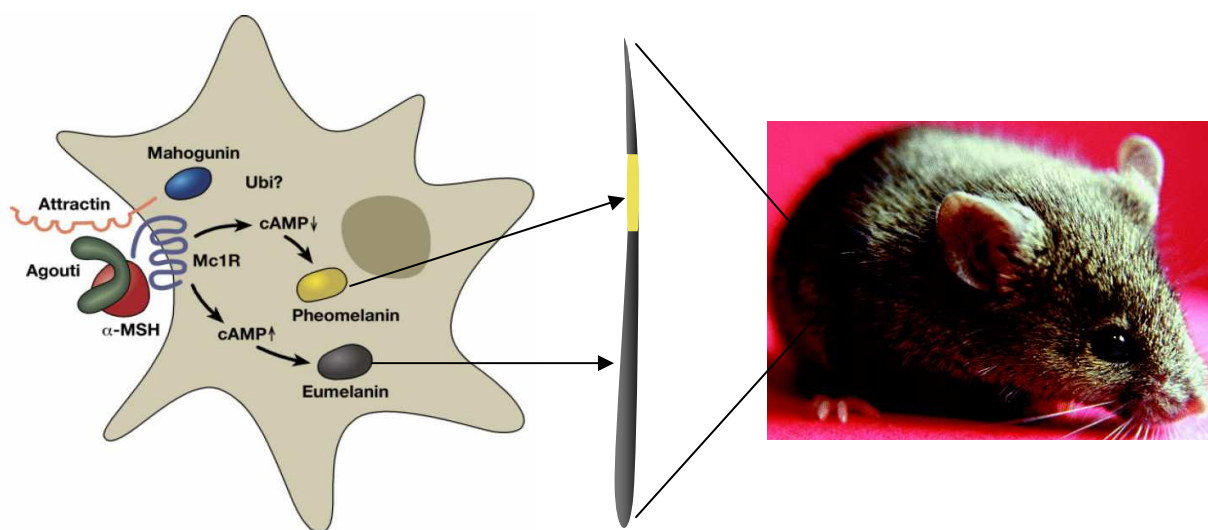


Figure 18 : Etablissement du phénotype agouti chez la souris.

La fixation de α -MSH sur MC1R conduit à une synthèse à l'eumélanine, alors que l'interaction d'agouti avec le même récepteur favorise la synthèse de pheomélanine 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) 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-Reh fuss 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). Le facteur MITF, spécifique de la lignée mélanocytaire, active les gènes centraux de la mélanogenèse que sont Tyr, Tyrp1, Dct, Mart-1 et Pmel17 (Du et al., 2003; Goding, 2000), conduisant à la synthèse d'eumélanine.

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 mélanogenèse et a pour conséquence un pelage jaune chez la souris. En revanche, une mutation gain de fonction du récepteur (E^D) provoque une activation constitutive de la mélanogenèse et donc un pelage noir (Bennett et Lamoreux, 2003). Le rôle de MC1R dans la pigmentation a été largement étudié chez les animaux domestiques, de laboratoire et les oiseaux (Haitina et al., 2007). Dans la majorité des cas, les mutations perte de fonction engendrent une pigmentation pheomélanique (rouge/jaune) alors que les mutations gain de fonction induisent une coloration eumélanique (noire). Chez l'homme, plus de 70 allèles du gène *MC1R* ont été décrits et plusieurs mutations perte de fonction ségrégent dans les populations européennes et sont associées aux cheveux roux et aux peaux blanches (Abdel-Malek et al., 2008; Valverde et al., 1995). De façon remarquable, l'allèle sauvage est prédominant chez les populations africaines, où la protection eumélanique est requise pour une bonne photoprotection dans un environnement très ensoleillé (Abdel-Malek et al., 2008). Dans ce contexte, il est à noter que parmi les différents mécanismes qui régissent la régulation de *MC1R* son expression est stimulée par la lumière ultraviolette (Garcia-Borron et al., 2005).

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 le sixième jour de 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 suppresseurs d'*Agouti*, les mutations *Mahogany* et *Mahoganyoid* (Miller et al., 1997) empêchent la production de pheomélanines. Par ailleurs, *Mahogany* n'a pas d'effet sur le phénotype pheomélanique des souris *Mc1re/Mc1re*, ce qui suggère que le produit de *mg* (*Mahogany*) agit au même niveau ou en amont du récepteur aux mélanocortines (Nagle et al., 1999).

Récemment, Enshell-Seijffers et al (2008) ont reporté des évidences de l'implication d'une protéase codée par le gène *Corin* dans la régulation de la synthèse de la pheomélanine. Cette protéase agit en aval de la protéine *Agouti* et favorise la synthèse des pigments noirs (eumélanine). Le gène *Corin* a été identifié en cherchant des gènes qui s'expriment spécifiquement dans la papille dermique. Au niveau de la peau *Corin* s'exprime uniquement au niveau de la papille dermique. Chez les souris invalidées pour ce gène les bandelettes jaunes caractéristiques des poils agouti sont plus larges que celles des souris sauvages agouti (**figure 19 C**). Par conséquent, elles ont un pelage plus clair que les souris sauvages.

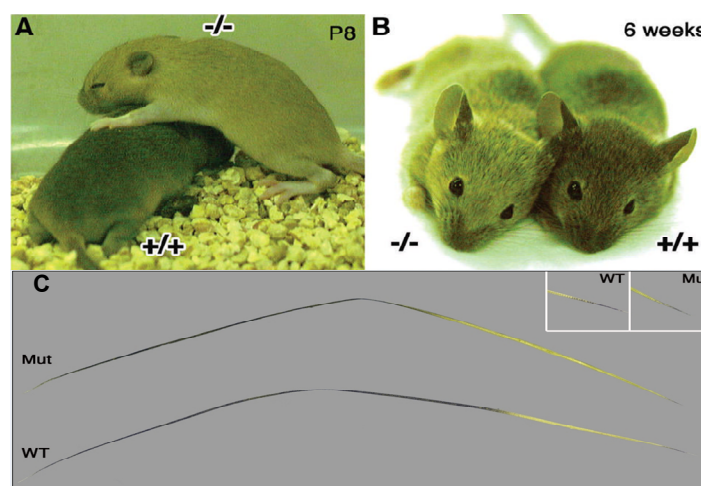


Figure 19 : Pelage de souris invalidée (-/-) pour le gène *Corin* par rapport aux souris sauvages (+/+). Souris (-/-) et sauvage 8 jours (A) et 6 semaines post-natal (B).Le pelage claire des souris *Corin* -/- est du à un élargissement de la bande jaune agouti (C). Wt : sauvage ; Mut : mutant (invalidé pour le gène *Corin*).

En effet, des variations modestes de la largeur des bandes jaunes peuvent induire une variation notable de la coloration apparente du pelage. Bien que la fonction exacte de *Corin*

dans la pigmentation ne soit pas connue aujourd'hui, il semblerait que son mode d'action constitue un mécanisme d'adaptation pour les changements de couleur pour les animaux qui possèdent à la base un phénotype agouti.

II.6 Les mutations induisant une pigmentation de la peau noire chez la souris

Les gènes de coloration que nous avons abordés jusqu'à maintenant ont été identifiés pour la plupart d'entre eux sinon tous sur la base de leurs différents allèles et leurs impacts sur la coloration du pelage. En effet, chez la souris, les mélanocytes sont principalement confinés dans le follicule pileux à l'exception des oreilles, la plante des pattes, le nez et la queue. Chez l'homme et d'autres mammifères (bovin, porc...) les mélanocytes colonisent le follicule pileux et sont aussi dispersés entre les kératinocytes de l'épiderme. Jusqu'à récemment, il n'existait pas de modèle murin pour l'étude génétique de la pigmentation de la peau. L'utilisation de criblage de mutations induites à grande échelle a permis l'identification d'une classe de mutants (*Dsk*) de souris avec une pigmentation noire de la peau. (Fitch et al., 2003; Van Raamsdonk et al., 2004). Ces mutations engendrent soit une pigmentation noire de l'épiderme ou du derme (Fitch et al., 2003). Certaines mutation comme *Dsk1* et *Dsk7* correspondent à des mutations des gènes *Gnaq* et *Gna11* qui codent deux sous unités G_{α} , impliquées dans la transduction des signaux des récepteurs couplés aux protéines G (Van Raamsdonk et al., 2004). Chez ces mutants, il existe un excès de mélanoblastes au début du développement. Bien que le nombre normal de mélanoblastes atteint l'épiderme et le follicule pileux, l'excédent se retrouve dans le derme, probablement suite à une activité régulatrice au niveau de la membrane basale. Une telle régulation reste spéculative pour le moment.

II. 7 La régulation de la pigmentation cutanée

II.7.1 Pigmentation constitutive de la peau

Selon les races/ethnies (**figure 20**) la coloration de la peau humaine présente une pigmentation allant du Blond/claire à une coloration noire/sombre. Néanmoins, il est à noter que la densité des mélanocytes est la même pour une zone donnée entre les différents types de peaux (Tadokoro et al., 2003).

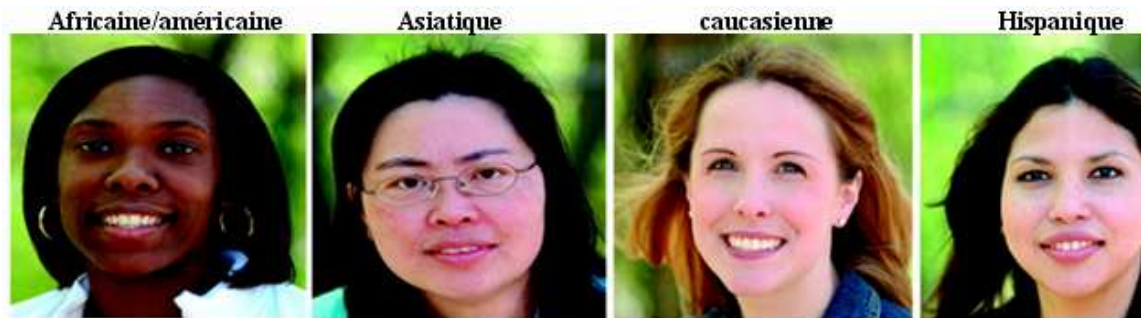


Figure 20 : Les variations de la couleur de la peau humaine (Tadokoro et al., 2003).

Les kératinocytes dans les peaux claires tendent à rassembler leurs mélanosomes faiblement pigmentés au dessus du noyau, alors que dans les peaux noires, les mélanosomes fortement pigmentés sont distribués individuellement dans les kératinocytes, ce qui permet un maximum d'absorption de la lumière (**figure 21**).

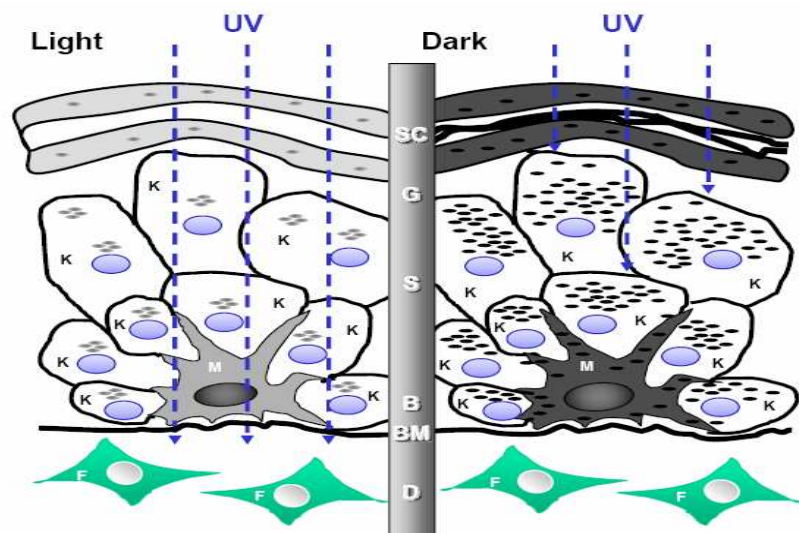


Figure 21 : La peau noire et blanche.

SC, stratum corneum ; G, stratum granulosum; S, stratum spinosum; B, stratum basale ; BM, basement membrane ; D, derme ; Types de cellules : K, kératinocytes ; M, mélanocytes ; F, fibroblaste.

Il existe une large variation intra-individu de la densité des mélanocytes dans différentes régions du corps. A titre d'exemple on peut citer les paumes des mains et les plantes des pieds où les différences sont très visibles par rapport au reste du corps chez les populations africaines. Les mélanocytes épidermiques prolifèrent très peu, sinon pas du tout, dans les circonstances normales, et ils sont assez résistantes à l'apoptose, de part leur forte expression de *Bcl2* (McGill et al., 2002).

La différenciation et la densité des mélanocytes sont influencées par l'environnement incluant les UVs et des facteurs sécrétés par les kératinocytes avoisinants et les fibroblastes (figure 22).

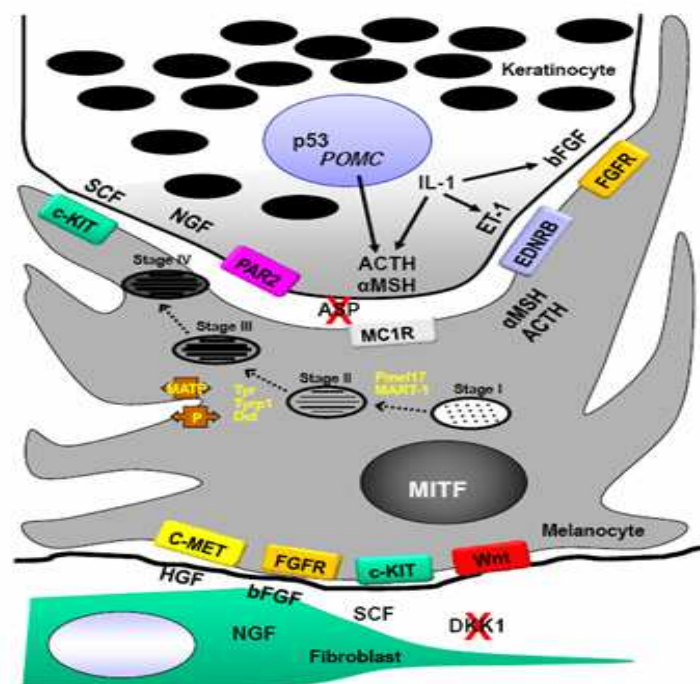


Figure 22 : Représentation schématique des récepteurs et leurs ligands ainsi que les autres facteurs qui régulent la pigmentation de la peau chez l'homme (Yamaguchi et al., 2007a).

Il a été récemment montré par exemple, que les fibroblastes sécrètent dans le derme des plantes des pieds et des paumes des mains une forte quantité de DKK1 qui inhibe la croissance et la fonction des mélanocytes en inhibant la voie des signaux Wnt/ β -catanine (Yamaguchi et al., 2004; Yamaguchi et al., 2007b). L'inhibition de la voie Wnt dans le mélanocyte inhibe fortement la voie de la mélanogénèse en affectant la transcription des facteurs comme *Mitf* mais aussi en inhibant la production de protéines mélanogéniques. DKK1 affecte également les kératinocytes en réduisant leur pouvoir de phagocytose des mélanosomes ce qui atténue la pigmentation. Comme pour la mélanogénèse au niveau du

follicule pileux, MC1R (et ses ligands) constitue un des déterminants majeurs de la pigmentation de la peau.

En résumé, la pigmentation constitutive de la peau est déterminée par

- a) la migration des mélanoblastes vers l'épiderme,
- b) leur survie et leur différenciation en mélanocytes
- c) la densité des mélanocytes
- d) l'expression/fonction des constituants enzymatiques et structuraux des mélanosomes
- e) la synthèse des différents types de mélanine (eu- et pheomélanine)
- f) le transport des mélanosomes aux dendrites du mélanocyte
- g) le transfert des mélanosomes aux kératinocytes et finalement la distribution des mélanines au niveau de la peau.

II.7.2 La Régulation facultative de la pigmentation de la peau

La pigmentation facultative de la peau désigne une augmentation de la coloration de la peau engendrée par certaines régulations physiologiques. Plusieurs facteurs régulent la coloration constitutive de la peau. Le plus évident et le plus couramment utilisé sont les UVs. On parle alors d'une réaction de bronzage (Eller et Gilchrist, 2000; Tadokoro et al., 2003). Les radiations UVs sont les facteurs qui influencent le plus la pigmentation de la peau chez l'homme. En effet, leur action est assez immédiate (quelques minutes) et persiste plusieurs jours. Cependant cette augmentation rapide de la quantité de pigments résulte seulement de l'oxydation de pigments préexistants et la redistribution des mélanosomes sans augmentation de la mélanogénèse. Un bronzage tardif peut également avoir lieu, mais ce dernier nécessite plus de temps car il implique la fonction du mélanocyte. L'exposition aux UVs conduit à une augmentation de l'expression de MITF (régulateur majeur de la transcription de la pigmentation) et ces cibles en aval incluant Pmel17, MART-1, TYR, TRP1 et DCT (Miyamura et al., 2007; Yamaguchi et al., 2005) conduisent éventuellement à l'augmentation du contenu en pigments (**figure 23**).

Les mélanocytes épidermiques et les kératinocytes répondent également à une exposition aux UVs en augmentant leurs productions en α -MSH et ACTH, qui, à leur tour, engendrent une régulation positive de l'expression de MC1R et sa fonction et par conséquent stimulent les réponses de MC1R à ces ligands mélanocortines.

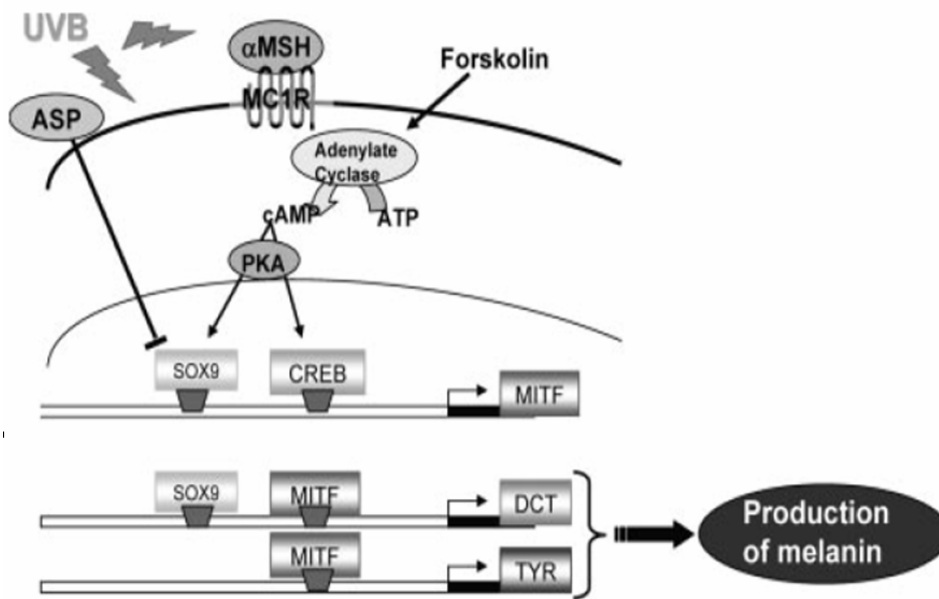


Figure : 23 Représentation schématique de l'induction de la pigmentation facultative par les UVB. Les radiations par les UVB au moins via l'activation de l'AMPC et PKA, induisent l'expression de *SOX9* et *CREB*, deux facteurs de transcription nécessaires à l'activation de la mélanogénèse.

Des variants de *MC1R* qui fonctionnent faiblement ont été identifiés chez les individus avec des cheveux roux et une peau blanche pheomélanique, et par conséquent une faible capacité à bronzer. L'expression de l'endothéline-1 produite par les kératinocytes est également augmentée en réponse aux UVs. Cette augmentation de l'expression de *MC1R*, bien qu'elle agisse via son propre récepteur (*EDNRB*) situé à la surface du mélanocyte. La sécrétion de l'interleukine 1 par les kératinocytes est également obtenue par les UVs et stimule la sécrétion de l' α -MSH, l'ACTH et l'endothéline-1 et bFGF par les kératinocytes. D'autres facteurs mélanogéniques produits par les kératinocytes en réponse aux UVs incluent SCF et NGF. Ce dernier est impliqué dans la protection des mélanocytes d'une mort cellulaire par apoptose suite à une exposition aux UVs (Kadekaro et al., 2003). Les UVs affectent également les fibroblastes dans le derme, et les facteurs de croissances secrétés à partir de ces cellules en réponse aux UVs incluent HGF, bFGF et SCF. Tous ces facteurs stimulent la mélanogénèse via leur récepteur au niveau des mélanocytes (Imokawa, 2004).

II.8 Le transfert des mélanosomes aux keratinocytes : une étape clé de la pigmentation cutanée

Bien que la pigmentation de la peau reflète le type de pigment synthétisé par les mélanocytes épidermiques, deux autres processus sont nécessaires et doivent par conséquent se dérouler correctement : 1) l'efficacité de transfert des mélanines aux kératinocytes ; 2) la distribution et la dégradation des mélanosomes transférés par les cellules réceptrices : les kératinocytes.

Le mécanisme moléculaire du transfert des mélanosomes aux kératinocytes constitue l'une des boîtes noires dans le domaine de la pigmentation. Cependant, ces dernières années un ensemble de travaux commence à élucider cette facette de la pigmentation chez les mammifères.

II.8.1 Le transfert des mélanosomes le long des dendrites

Une fois synthétisés par les mélanocytes épidermiques les mélanosomes pigmentés migrent vers les extrémités des dendrites et sont capturés par divers éléments du cytosquelette. Le complexe protéique formé par Rab27a (Ashen), Myo-5 (dilute) et MLPH, (leaden), et probablement par d'autres facteurs, facilite le transport intracellulaire et leurs ultimes captures à l'extrémité des dendrites du mélanocyte. Plusieurs maladies humaines associées à un défaut de migration vers les extrémités ont été décrites. La forme du syndrome de Griscelli combinant un albinisme partiel avec une immunodéficience sévère est le résultat d'une mutation de *RAB27a* (Menasche et al., 2000) alors qu'une autre forme du même syndrome associée à une maladie neurologiques est le résultat d'une mutation affectant *MYO5A* (Pastural et al., 1997 ; Menasche et al., 2000). Les modèles murins correspondants à ce syndrome sont respectivement les souris ashen (ash) (Wilson et al., 2000) et la souris dilute (d) (Menasche et al., 2000).

II.8.2 Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes

Une fois capturés, aux niveaux des extrémités, les mélanosomes sont incorporés aux kératinocytes avoisinants. Un mélanocyte transfère ses mélanosomes à environ 36 kératinocytes (Frenk et Schellhorn, 1969) chez toutes les races et les groupes ethniques, on parle alors d'une unité mélanique épidermique (Fitzpatrick et Breathnach, 1963). PAR-2 (Proteinase-Activated receptor) joue un rôle crucial dans ce transfert. Des lectines de surface et des glycoprotéines y sont également impliquées. Une fois incorporés dans le kératinocyte,

les mélanosomes sont distribués individuellement ou en cluster au pôle apical du noyau. Ils sont dégradés quand le kératinocyte subit sa différenciation terminale et la desquamation.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes.

II.8.2.1 L'exocytose

L'exocytose est un processus utilisé par certaines cellules pour sécréter le contenu de leurs vésicules ou de leurs organites dans un but de communication, de contact, ou de transmission d'un signal à d'autres cellules. Ce mécanisme est utilisé au niveau des synapses des cellules nerveuses, les cellules endocrines et exocrines, et les cellules hématopoïétiques à titre d'exemple (Burgoyne et Morgan, 2003).

Lors de l'exocytose, les membranes plasmiques de la cellule et de son organite (ou sa vésicule) fusionnent. Selon le principe de l'exocytose, le transfert des mélanines est accompli par la fusion de la membrane du mélanosome avec la membrane plasmique du mélanocyte, ce qui permet leur libération dans le milieu extracellulaire suivi de leur phagocytose par les kératinocytes (**figure 24**).

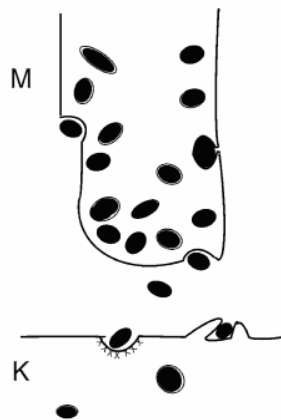


Figure 24 : Transfert des mélanosomes du mélanocyte (M) vers le kératinocyte (K) par exocytose. Les mélanines sont secrétées à l'extérieur du mélanocyte par fusion membranaire du mélanocyte et son organite le mélanosome. Les mélanines sont ensuite phagocytées par endocytose par le kératinocyte.

Ce modèle a été proposé à la suite d'observations au microscope électronique au niveau de la peau humaine et des follicules pileux décrivant des 'mélanines nus' dans l'espace intercellulaire entourés par les pseudopodes des kératinocytes ou des puits de clathrine (clathrin-coated pits) (Swift, 1964; Yamamoto et Bhawan, 1994). Par ailleurs, la libération des mélanines dans l'espace extracellulaire par les mélanocytes est stimulé par l' α -MSH (α -

Melanocyte Stimulating Hormone) (Virador et al., 2002). En accord avec ce modèle, le mélanocyte exprime des facteurs impliqués dans le processus de l'exocytose comme les SNAREs et les Rab-CTPases. Plusieurs SNAREs ont été identifiés dans des fractions cellulaires enrichies en mélanosomes comme SNAP23, SNAP25 et VAMP2. En plus, le mélanocyte exprime Rab3a qui est un membre de la famille Rab3 comportant Rab3a à Rab3d. Cette famille de Rab GTPase joue un rôle central dans la régulation de l'exocytose (Scott et al., 2001). Certains auteurs suggèrent que Rab27a joue aussi un rôle dans la fusion membranaire mélanocyte/mélanosome de part son rôle avéré dans le transport intracellulaire du mélanosome vers les dendrites des mélanocytes et le fait qu'il est impliqué dans la régulation de l'exocytose de divers types cellulaires (Fukuda, 2005).

II.8.2.2 La cytophagocytose

La cytophagocytose désigne la phagocytose de l'ensemble ou seulement d'une partie d'une cellule viable. Lors du transfert des mélanines, il consiste à la phagocytose d'une partie du mélanocyte, généralement l'extrémité de la dendrite, par le kératinocyte (**figure 25**). Le contact des extrémités des dendrites des mélanocytes avec les kératinocytes avoisinants stimule ce processus. Des poches de mélanosomes remplis de mélanines se retrouvent alors à l'intérieur des kératinocytes. Ces vésicules sont ensuite transportées vers la région nucléaire avec une digestion de leurs membranes. Enfin, les grains de mélanines sont libérés et dispersés dans le cytoplasme du kératinocyte (Van Den Bossche et al., 2006). Ce modèle de cytophagocytose a été suggéré essentiellement sur la base des données obtenues en microscopie électronique (Okazaki et al., 1976; Yamamoto et Bhawan, 1994).

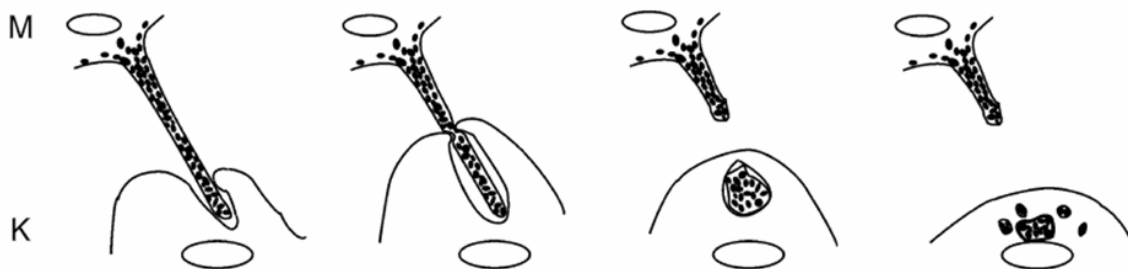


Figure 25 : La cytophagocytose. L'extrémité du dendrite du mélanocyte (M) est phagocytée par le kératinocyte (K).

II.8.2.3. La fusion des membranes plasmiques

Le troisième mécanisme qui a été suggéré consiste en la fusion des membranes des kératinocytes et des mélanocytes qui induit la formation d'un canal par lequel les

mélanosomes sont transportés (**figure 26**) (Bhawan, 1979; Garcia et al., 1979). Par microscopie électronique, on a démontré la connexion cytoplasmique reliant directement des mélanocytes et des kératinocytes en co-culture.

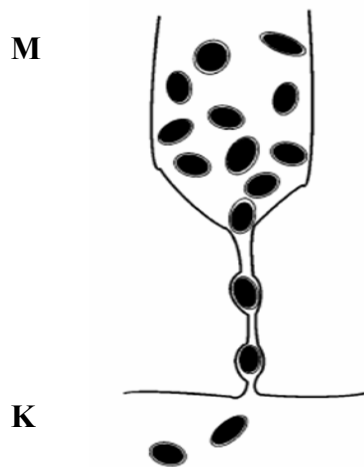


Figure 26 : La Fusion des membranes plasmiques. Les membranes cellulaires des deux types de cellules fusionnent engendrant la formation d'un canal qui permet le passage des mélanosomes. Mélanocyte (M) ; Kératinocyte (K).

II.8.2.4 Transfert via des vésicules membranaires

Selon ce mécanisme, les mélanosomes se concentreraient aux niveaux des extrémités des dendrites et seraient libérés dans le milieu sous formes de vésicules. Ces dernières seraient alors phagocytées par les kératinocytes. Ce mécanisme de transfert a été signalé par Cerdan et ses collègues (Cerdan et al., 1992) qui ont montré grâce à la technique de cytométrie en flux que des cellules humaines de mélanome libèrent activement des vésicules membranaires dans le milieu de culture (**figure 27**).

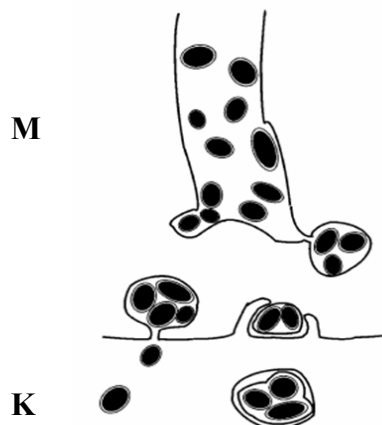


Figure 27 : Transfert via des vésicules membranaires. Mélanocyte (M) ; Kératinocyte (K).

Le mélanosome est déversé sous forme de vésicules, qui fusionnent avec des kératinocytes ou phagocytés par ces derniers.

II.9 Rôle de PAR-2 (Proteinase-Activated Receptor 2) dans la pigmentation

PAR-2 appartient à la famille des PARs (Proteinase-Activated Receptors); une nouvelle famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines Gs (GPCR). Les PARs sont activés par un mécanisme unique mettant en jeu un clivage protéolytique de leur extrémité N-terminale par des sérines protéases. La nouvelle extrémité N-terminale ainsi générée et, qui fait partie intégrant du récepteur, sert alors de ligand pour activer la transduction de signal du PAR correspondant.

Ces huit dernières années, plusieurs travaux ont démontré le rôle de *PAR-2* dans la pigmentation cutanée (Seiberg et al., 2000b).

Dans l'épiderme, *PAR-2* est exprimé dans les kératinocytes (Derian et al., 1997), mais pas dans les mélanocytes (Marthinuss et al., 1995; Sharlow et al., 2000). Il est impliqué dans la phagocytose des mélanosomes (Sharlow et al., 2000). *PAR-2* exerce un rôle régulateur sur la pigmentation de la peau, et la modulation de son activité peut augmenter ou diminuer la pigmentation aussi bien in vitro, chez les animaux modèles qu'au niveau de la peau humaine (Paine et al., 2001; Seiberg et al., 2000a, 2000b). L'activation du récepteur *PAR-2* augmente le niveau de la phagocytose et engendre une augmentation du transfert des mélanines in vitro et in vivo (Paine et al., 2001; Seiberg et al., 2000a, , 2000b). Par ailleurs, les irradiations ultraviolettes induisent l'expression de *PAR-2* et, l'inhibition de ce dernier prévient la pigmentation facultative induite par les UVs. En plus, l'expression de *PAR-2* et l'induction par les UVs dépendent du type de peau, avec une forte expression et une induction prononcée chez les individus de peau noire (Babiarz-Magee et al., 2004; Scott et al., 2001). En plus, une corrélation a été démontrée entre la pigmentation constitutive de la peau humaine, l'expression de *PAR-2* et l'activation de son produit, le récepteur *PAR-2* (Babiarz-Magee et al., 2004).

L'activation de *PAR-2* conduit à la sécrétion de la sérine protéase par les kératinocytes créant ainsi un contrôle positif par feed-back. D'une façon similaire, à la phagocytose des cellules du système immunitaire, la phagocytose kératinocytaire met en jeu l'activation de Rho-GTP (Rho-GTP est surexprimé quand *PAR-2* est activé). Par ailleurs, l'inactivation de Rho ou ces effecteurs en aval (kinases Rho) abolissent la stimulation de la phagocytose par *PAR-2* (Scott et al., 2003).

En dehors de ce rôle avéré de l'implication de *PAR-2* dans la phagocytose des mélanosomes, il participe également au développement des dendrites des mélanocytes. En effet la stimulation de *PAR-2* au niveau des kératinocytes induit une sécrétion de

prostaglandines PGE2 et PGF2 α par ces derniers. Les prostaglandines se fixent à la surface des mélanocytes et induisent le développement des dendrites (Scott et al., 2004).

Le contact dendrites/kératinocytes est une étape requise pour cette fonction de PAR-2 (Seiberg et al., 2000b). Le site d'adhésion mélanocyte-kératinocyte est comparable aux jonctions plus spécialisées entre les neurones (les synapses neuronales) et entre les cellules immunes (les synapses immunologiques). Ainsi, le site de contact mélanocyte/kératinocyte peut être considéré comme synapse pigmentaire (Friedl et Storim, 2004; Grimsley et Ravichandran, 2003; Stuart et Ezekowitz, 2005). Les cadhérines jouent un rôle majeur dans l'établissement de l'adhésion mélanocyte-kératinocyte. C'est une famille de glycoprotéines qui initie les adhésions cellules/cellules Ca²⁺ dépendantes. Elles servent également comme des constituants transmembranaires impliqués dans l'adhésion.

Les E-cadhérines et P-cadhérin sont exprimés dans les mélanocytes et les deux initient l'adhésion du mélanocyte au kératinocyte (Minwalla et al., 2001). Par analogie à la synapse phagocytaire, la synapse pigmentaire fait intervenir des lectines (Stuart et al., 2005). Ce sont des récepteurs d'adhésion qui se lient à des résidus de sucres qui se présentent à une partie délimitée de la surface membranaire. Les lectines qui se lient aux résidus de galactose sont plus effectives que celles qui se lient aux résidus mannoses (Cerdan et al., 1992). Un modèle hypothétique de la synapse pigmentaire est représenté dans la **figure 28**. Le modèle présente des molécules dont on a établi un rôle dans le transport ou le transfert des mélanosomes : PAR-2, le complexe Rab27a-melanphilin-MyosineVa et les lectines, ainsi que des molécules avec un rôle putatif dans le transfert : E-cadhérine et les SNAREs et, les Rabs impliqués dans la fusion des membranes plasmiques du mélanocyte et de son organite ; le mélanosome.

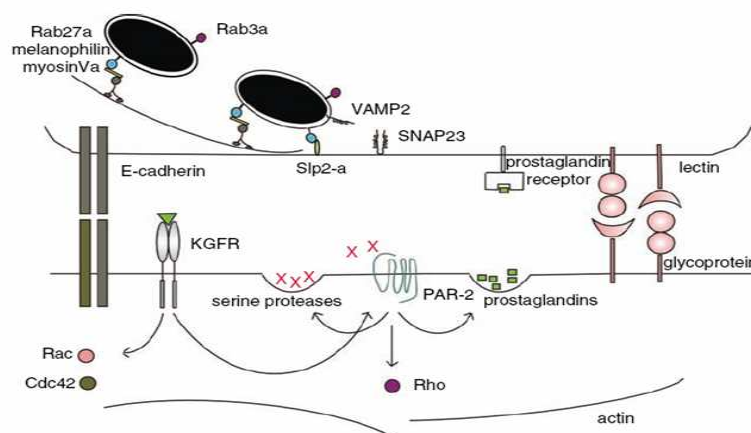


Figure 28 : La synapse pigmentaire.

Bien que l'ensemble de ces travaux soulignent l'importance de PAR-2 dans la pigmentation cutanée, les mécanismes moléculaires qui régissent son expression, son turnover, son trafic intracellulaire, bref sa régulation sont peu connus. Néanmoins les données acquises dans le cas de l'étude d'un autre récepteur de la même famille PAR, en l'occurrence PAR-1 permettent de suggérer un certain nombre de données qui pourraient s'appliquer à PAR-2. Par ailleurs, les récepteurs PARs présentent des similitudes avec les autres GPCRs (récepteur couplés aux protéines Gs) à sept domaines transmembranaires qui sont les mieux étudiés aujourd'hui.

II. 9.1 Les gènes de la famille PAR

L'analyse de la structure et la localisation chromosomique des gènes *PAR-1* et *PAR-2* suggèrent l'existence d'une large famille de PARs. Bien que *PAR-1* et *PAR-2* présente 35% seulement d'identité au niveau protéique, les deux gènes correspondants sont co-localisés sur le chromosome 5q13, à une distance inférieure à 100 kbp l'un de l'autre (Schmidt et al., 1996; Schmidt et al., 1997). L'organisation de *PAR-1* et *PAR-2* chez les rongeurs et chez l'homme est pratiquement identique. Les gènes des deux récepteurs se composent de deux exons séparés par un intron de 10-20 kpb (**figure 29**). Le premier exon code 29 acides aminés pour les deux gènes humains, alors que le second exon plus large code la majorité partie de la protéine et le site de clivage par les sérines protéases.

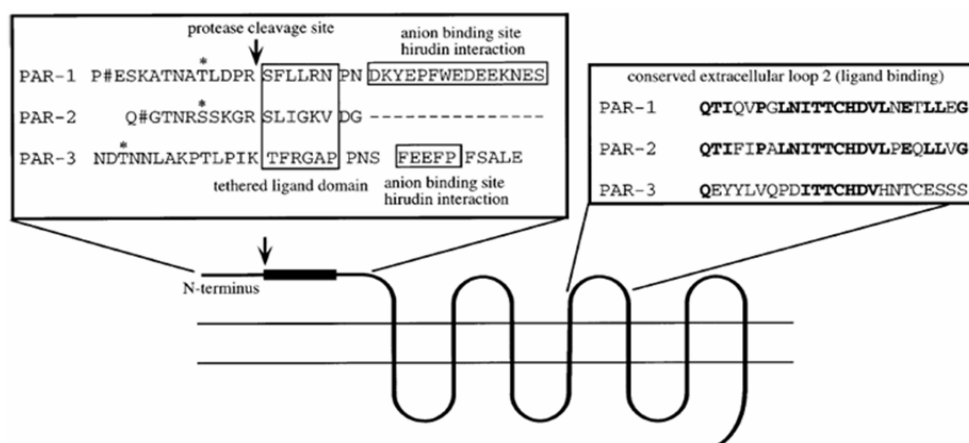


Figure 29 : Représentation schématique de la structure de PAR-1, PAR-2 et PAR-3. Les résidus de la partie N-terminale et ceux de la deuxième boucle extracellulaire qui sont importants pour l'activation des récepteurs sont indiqués. La flèche indique le site de clivage par une sérine protéase, qui démasque le peptide (encadré) activateur (ligand) du récepteur. Encadré également, 'anion binding sites' de PAR-1 et PAR-3.

Les récepteurs PAR sont exprimés dans différents tissus par diverses cellules et ils sont impliqués dans divers processus incluant la croissance et le développement, la mitogenèse et l'inflammation. De part l'activation irréversible du récepteur par son propre ligand qui lui est physiquement attaché, il existe des mécanismes efficaces pour achever la signalisation et, prévenir ainsi une stimulation non-contrôlée. Il s'agit du clivage du ligand attaché au récepteur, la phosphorylation et le découplage du récepteur des protéines Gs, l'endocytose et la dégradation lysosomale du récepteur activé.

II.9.2 Mécanismes de l'activation des PARs

En dépit de l'extrême diversité des agonistes des GPCRs (des photons jusqu'aux sérines protéases), l'activation de ces derniers implique plusieurs étapes communes à la majorité d'entre eux (**figure 30**). La première étape consiste en l'interaction du ligand avec son récepteur. Les agonistes de la plupart des GPCRs connus sont des petites molécules hydrophiles comme les catécholamines ou peptides qui sont solubles dans le fluide extracellulaire. Ces agonistes se fixent aux domaines extracellulaires et transmembranaires de leurs récepteurs au niveau de la surface cellulaire.

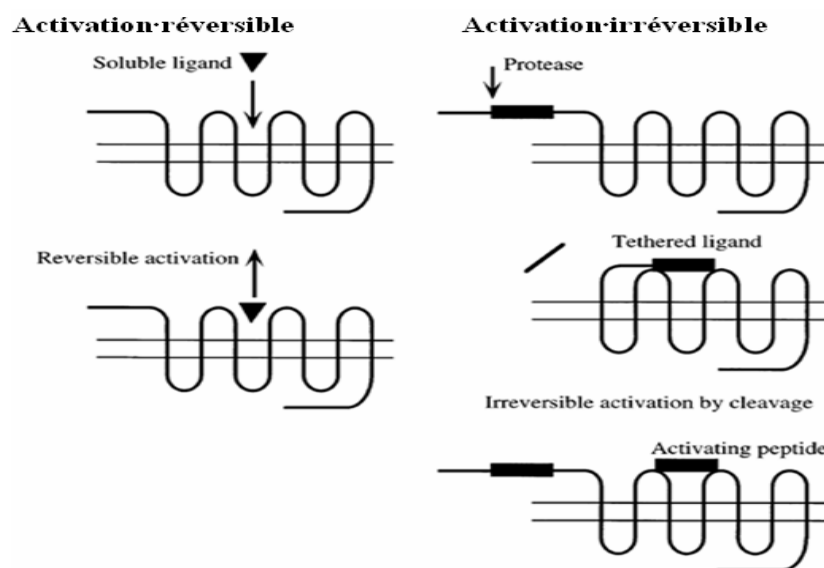


Figure 30 : Mécanisme d'activation des GPCRs.

Activation réversible par fixation de ligand soluble comme les neuropeptides et activation irréversible par clivage par une protéase.

Les sérines protéases qui sont traditionnellement considérées dans la dégradation des protéines extracellulaires sont également des molécules de signalisation qui régulent de multiples fonctions cellulaires en activant des récepteurs spécifiques : les PARs (Proteinase-

Activated Receptors). Cette activation implique la reconnaissance du récepteur par l'enzyme, le clivage du récepteur à un site spécifique à l'intérieur de l'extrémité extracellulaire N-terminale, et finalement la génération d'une nouvelle extrémité N-terminale qui agit comme ligand physiquement attaché au récepteur pour activer ce dernier.

Des acides aminés spécifiques (généralement six résidus) du ligand attaché interagissent avec des domaines extracellulaires et transmembranaires du récepteur clivé. La deuxième étape de l'activation du GPCRs est le changement de conformation du récepteur. Finalement, le récepteur dans une conformation active interagit avec les protéines Gs au niveau de la membrane plasmique qui transduit le signal.

PAR-1 est le membre le mieux étudié de cette famille et le mécanisme de son activation est assez bien établi. L'extrémité NH₂-terminale extracellulaire (**figure 29**) de PAR-1 humain contient le site de clivage (LDPR⁴¹↓S⁴²FLLRN). Le remplacement de la Ser⁴² par une Pro abolit le clivage et l'activation du récepteur par la thrombine. Cette région de clivage est suivie d'une séquence de résidus (D⁵¹KYEPP⁵⁶) chargée négativement (Vu et al., 1991a; Vu et al., 1991b). Le domaine chargé interagit avec un domaine de la thrombine (anion binding site), pour un clivage optimum. La délétion de ce domaine abolit l'activation de PAR-1 par la thrombine (Vu et al., 1991b).

Le clivage par la thrombine engendre une nouvelle séquence NH₂-terminale (S⁴²FLLRN), qui se fixe au site d'activation du récepteur. Des peptides synthétiques qui correspondent au domaine du peptide attaché activent PAR-1 sans que ce dernier soit préalablement clivé (Scarborough et al., 1992).

Au sein du peptide activateur (S¹F²L³L⁴R⁵N), l'arginine (R⁵) joue un rôle critique dans l'interaction avec Glu260 de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur et par conséquent l'activation de ce dernier (Friedl et Storim, 2004; Grimsley et Ravichandran, 2003; Nanevicz et al., 1995; Nanevicz et al., 1996; Stuart et Ezekowitz, 2005). Deux autres acides aminés Phe² et Leu³ sont critiques dans l'activation du récepteur (Scarborough et al., 1992).

II. 9.2.1 L'activation de PAR-2

PAR-2, le second membre de la famille *PARs*, a été cloné pour la première fois chez la souris (Nystedt 1994). NH₂-terminale de PAR-2 murin (**figure 29**) contient le site de clivage (SKGR³⁴↓S³⁵LIGR) par la trypsine. Le remplacement de la Ser³⁵ par la Proline prévient le clivage par la trypsine et l'activation du récepteur (Bohm et al., 1996b; Nystedt et al., 1994). Par la suite, *PAR-2* a été cloné chez l'homme et le rat (Bohm et al., 1996a; Nystedt et al.,

1995a; Saifeddine et al., 1996). Les peptides synthétiques correspondant aux ligands dévoilés après clivage (SLIGRL chez la souris, SLIGKV chez l'homme) activent PAR-2 sans clivage préalable (Nystedt et al., 1995a; Nystedt et al., 1994; Nystedt et al., 1995b). Les résidus Leu² et Arg⁵ jouent un rôle critique dans l'interaction avec la deuxième boucle extracellulaire et l'activation du récepteur *PAR-2* murin (Lerner et al., 1996).

II. 9.2.2 Désactivation par d'autres protéases.

Certaines protéases clivent les PARs à des positions différentes des sites d'activation pour prévenir d'autres clivages activateurs (**figure 31**). En plus du site Arg⁴¹Ser⁴², la cathepsine G clive *PAR-1* aux sites Phe⁴³Leu⁴⁴ et Phe⁵⁵Trp⁵⁶, et rend le récepteur réfractaire à l'activation par la thrombine (Molino et al., 1995). De façon similaire, la tryptase clive également PAR-2 au site Lys⁴¹Val⁴² en plus du site d'activation Arg³⁴Ser³⁵ (Molino et al., 1997). Cependant le clivage activateur est probablement favorisé.

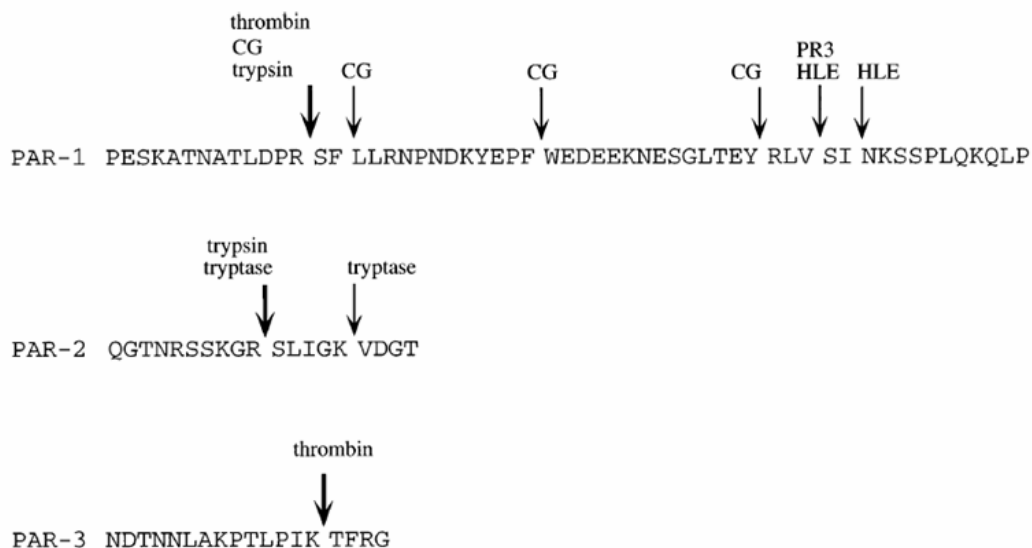


Figure 31 : Principaux sites de clivage de PAR-1, PAR-2 et PAR-3. CG, cathepsin ; PR3, proteinase 3; HLE, human leukocyte elastase.

Le clivage des *PARs* en des sites qui enlèvent le ligand constituerait un mécanisme de modulation supplémentaire de leurs activations. Le clivage pourrait servir également pour terminer la signalisation d'un récepteur.

II. 9.2.3 Signalisation par PAR-1 et PAR-2

PAR-1 est couplé à différentes protéines Gs, une caractéristique commune qu'il partage avec divers GPCRs. Son principal mécanisme de signalisation via les protéines $G\alpha_q$ conduit à l'activation de la phospholipase C- β , l'hydrolyse de phosphoinositide, et la formation de l'inositol triphosphate et le diacylglycerol engendrant une mobilisation de Ca^{2+} et l'activation de la protéine kinase C (**figure 32**) (Dery et al., 1998; Hung et al., 1992).

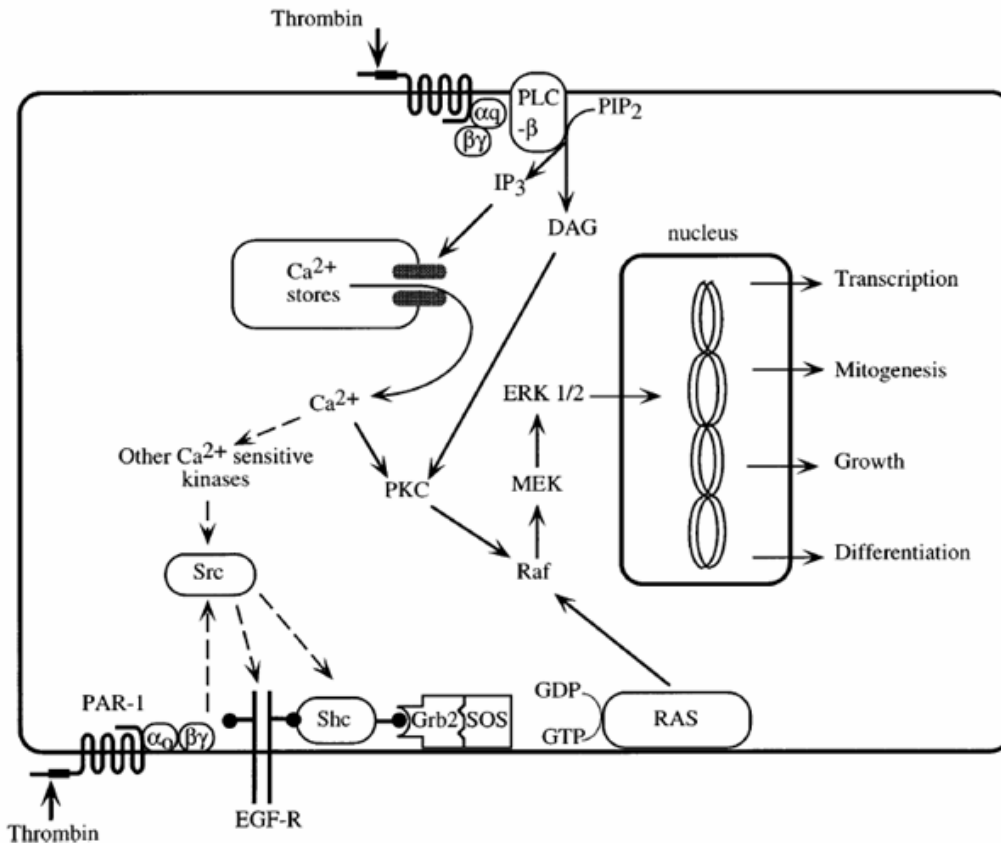


Figure 32 : Le Mécanisme de transductions du signal par PARs.

La voie de signalisation par PAR-2 est peu connue comparativement au prototype de la famille : PAR-1. Les agonistes de PAR-2 stimulent la génération de l'inositol triphosphate et la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire dans divers type cellulaire. Ainsi il est probable que PAR-2 est couplé à $G\alpha_q$ ou $G\alpha_0$. Dans les enterocytes et dans les cellules épithéliales rénales, les agonistes de PAR-2 stimulent la libération de l'acide arachidonique et la génération rapide des prostaglandines E2 et $F_{1\alpha}$ suggérant l'activation de la phospholipase A2 et la cyclooxygénase-1 (Dery et al., 1998). Dans les cellules du muscle lisse et les enterocytes, les agonistes de PAR-2 activent fortement les MAP kinases ERK-1/-2 et stimulent également p38.

II. 9. 2.4 L'activation des PARs

L'activation d'un PAR dépend de l'existence d'une enzyme (serine protéase) activée à une concentration suffisante dans le fluide extracellulaire mais aussi de PAR non clivé à la surface des cellules cibles où il sera activé par protéolyse et ainsi stimulera les voies de transductions des signaux. Le niveau de l'activité des protéases dépend de la présence d'inhibiteurs. La disponibilité de *PAR* non clivé au niveau de la surface cellulaire est gouverné qualitativement et quantitativement par son trafic intracellulaire. Ce dernier est modulé par les protéines G et les GRKs (G protein receptor kinases). La thrombine, l'activateur physiologique de PAR-1, est largement distribuée car elle fait partie de la cascade de coagulation. La trypsine pancréatique est l'activateur principal de PAR-2. La trypsine biologiquement active est présente dans la lumière du petit intestin, où elle active PAR-2 au niveau de la membrane apicale des enterocytes, mais PAR-2 est également rencontré dans divers tissus où il doit être activé par d'autres protéases avec une activité trypsine-like qui restent à identifier (Kong et al., 1997).

II. 9.2.5 Mécanismes de l'inactivation des PARs

Les réponses cellulaires aux serines protéinases et à la plupart des agonistes des GPCRs sont rapidement atténuées (Bohm et al., 1997). Les mécanismes d'atténuation de signaux sont particulièrement étudiés pour les GPCRs des hormones et des neurotransmetteurs (Bohm et al., 1997). Il existe plusieurs voies parallèles qui peuvent participer à l'atténuation des signaux (**figure 33**).

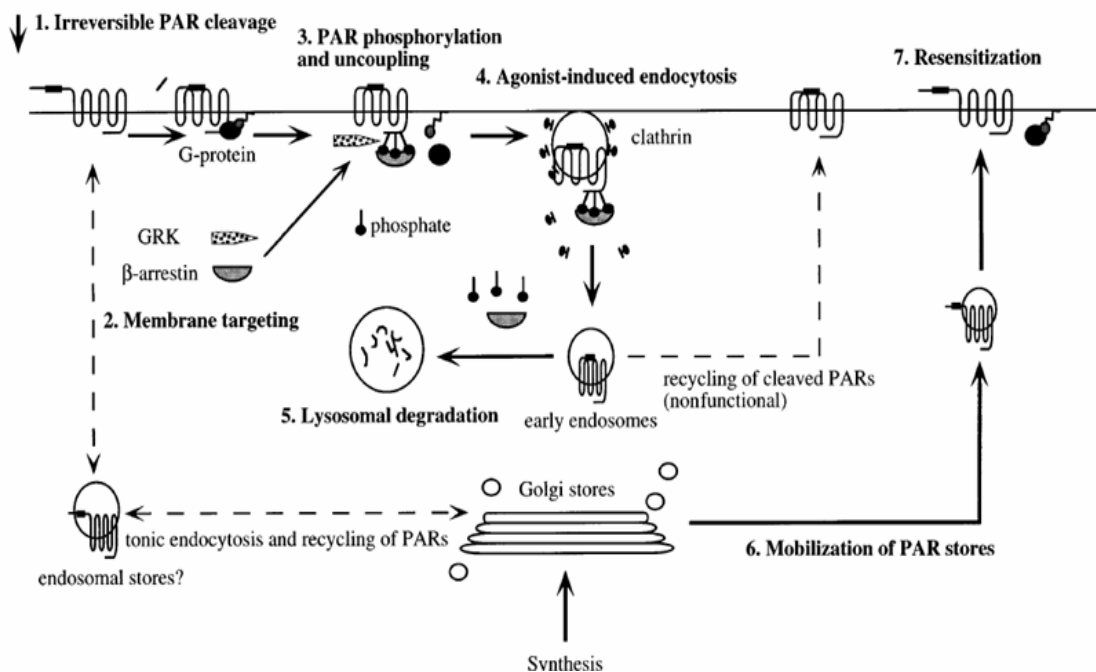


Figure 33 : Mécanismes potentiels impliqués dans la désensibilisation et le trafic des PARs.

Les signaux sont atténués par des mécanismes qui opèrent au niveau de l'agoniste, du récepteur et des protéines G et à diverses étapes en aval de la voie de signalisation.

La déplétion de l'agoniste du fluide extracellulaire est le premier mécanisme de l'atténuation. Plusieurs processus éliminent les hormones et les neurotransmetteurs à partir du fluide extracellulaire, incluant la diffusion et la dilution dans le liquide interstitielle, la capture par les transporteurs à hautes affinités et la dégradation enzymatique. La désensibilisation du récepteur a lieu généralement après une courte période (1 seconde à 1 minute) d'action de l'agoniste et elle est initiée par le découplage du récepteur activé des protéines Gs pour terminer la signalisation. L'endocytose contribue à la modulation des récepteurs actifs au niveau de la membrane plasmique. Les mécanismes qui atténuent la transduction des signaux par les PARs sont peu connus. Les données acquises soulignent des similitudes des différences avec les GPCRs aux hormones et neurotransmetteurs.

II. 9.2.5.1 Le clivage de PAR

Les agonistes solubles des GPCRs sont éliminés du fluide extracellulaire par diffusion, capture, et la dégradation enzymatique. L'ensemble de ces processus constitue le mécanisme premier de l'atténuation des signaux. De façon similaire, les protéases seraient éliminées de la proximité de leurs récepteurs cibles par diffusion et peuvent être inactivés par des inhibiteurs

de protéases et la dégradation. Cependant, une fois que le récepteur clivé et est activé, le ligand attaché maintient l'activation et il ne peut pas être éliminé par diffusion, dilution ou par capture. La présence continue d'un agoniste qui fait partie intégrante du récepteur présente des problèmes uniques pour la terminaison du signal.

Bien que la protéolyse soit le mécanisme physiologique de l'activation des PARs, les protéases peuvent également inactiver ce dernier. Le clivage à des sites différents du site d'activation pourrait rendre le récepteur réfractaire aux clivages activateurs. A titre d'exemple, des protéases comme la cathépsine G, l'élastase, et la protéinase 3 clivent PAR-1 et conduisent à l'élimination du domaine du ligand et conduisent ainsi à un récepteur qui ne répond plus à la thrombine (Molino et al., 1995; Renesto et al., 1997). Le clivage de l'agoniste peut également arrêter la signalisation

II. 9.2.5.2 La désensibilisation des PARs

Les événements de signalisation par les GPCRs incluant les seconds messagers comme l'AMPc et l'inositol 1, 4, 5-triphosphate sont souvent rapidement atténués par une régulation communément appelée la désensibilisation du récepteur. Un des processus majeurs de la désensibilisation est le découplage du récepteur activé des protéines Gs par phosphorylation du récepteur (Bohm et al., 1997). Les kinases responsables de cette phosphorylation agoniste-dépendent sont les GRKs (G protein receptor kinases). Ce mécanisme de désensibilisation dépend également des arrestines, cofacteurs fonctionnels des GRKs. L'importance des GRKs et les β -arrestine dans la désensibilisation de plusieurs GPCRs pour les hormones et les neurotransmetteurs est bien établie notamment pour les β 2-AR (Bohm et al., 1997). En présence des agonistes, β 2-AR est phosphorylé par GRK-2 et GRK-3. Les β -arrestines jouent le rôle de cofacteur pour les GRKs en se fixant sur les récepteurs phosphorylés et abolissent l'interaction entre le récepteur et les protéines Gs. L'implication de ce mécanisme dans la désensibilisation des PARs n'est pas connue. Cependant, ce processus devrait être un des mécanismes le plus important. En effet, une fois que le récepteur PAR est activé par clivage, la signalisation par le récepteur demeure continue étant donné que l'agoniste fait partie intégrante du récepteur.

PAR-1 et PAR-2 possèdent plusieurs sites consensus de phosphorylation par les GRKs dans leur extrémité C-terminale et le troisième domaine transmembranaire. Par ailleurs, on a pu montrer que la thrombine induit une rapide phosphorylation de PAR-1 exprimé dans des

cellules *in vitro*, et les GRKs sont responsables de cette phosphorylation (Ishii et al., 1994; Vouret-Craviari et al., 1995a; Vouret-Craviari et al., 1995b).

II. 9.2.5.3 L'endocytose et le trafic intracellulaire des PARs

Le mécanisme endocytose/trafic intracellulaire des *PARs* présente des similitudes et des différences avec l'endocytose/trafic intracellulaire des GPCRs aux hormones et les neurotransmetteurs qui sont particulièrement bien étudiés (Bohm et al., 1997). Après activation par protéolyse ou par les peptides activateurs, PAR-1 et PAR-2 subissent rapidement l'internalisation par endocytose via des puits de clathrines (Bohm et al., 1996b; Brass et al., 1994; Hein et al., 1994; Hoxie et al., 1993). PAR-1 et PAR-2 traversent rapidement les endosomes après leur internalisation et se retrouvent stockés dans les lysosomes (**figure 33**) contrairement à β 2-AR, qui reste majoritairement dans les endosomes. Après 30 et jusqu'à 60 min de stimulation avec les protéases ou les peptides activateurs, PAR-1 et PAR-2 sont détectés dans les lysosomes dans des cellules transfectées ou celles qui les expriment naturellement. Cependant ce ciblage aux lysosomes n'est pas complet car une portion des récepteurs activés et internalisés est recyclée au niveau de la membrane plasmique (Bohm et al., 1996b; Brass et al., 1994; Hoxie et al., 1993). Néanmoins, ces récepteurs clivés et recyclés ne sont plus des cibles des protéases activatrices (thrombine et tryptase par exemple) et l'importance physiologique de ce recyclage reste pour le moment inconnue.

II. 9.2.5.4 'Downregulation' des PARs

'Downregulation' est caractérisée par une diminution du nombre de récepteurs d'une cellule induit par une longue exposition (1h à 1 jour) aux agonistes caractérisée même si d'un point de vue physiologique il est rare qu'une cellule soit continuellement exposée aux agonistes. En effet différents mécanismes existent afin de les éliminer du fluide extracellulaire. Cependant une stimulation prolongée des récepteurs peut se produire dans des cas pathologiques (production continue d'agonistes) ou au cours d'un traitement thérapeutique qui nécessite une administration prolongée d'agoniste.

'Downregulation' de PAR-1 a été examinée dans des cellules mesangial (Zacharias et al., 1995). Une activation prolongée de PAR-1 conduit à une réduction prolongée du niveau du récepteur, alors que le niveau de l'ARNm reste inchangé. Ce résultat suggère qu'une augmentation de la dégradation du récepteur est le mécanisme principal de la 'downregulation'.

II. 9.2.6 La glycosylation et la fonction des PARs

La N-glycosylation est une caractéristique commune à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines Gs (GPCR). Cette modification post-traductionnelle a lieu au niveau des asparagines des séquences N-X-S/T (N : asparagine ; X : tout acide aminé à l'exception de la proline ; S : sérine ; T : Thréonine). Plusieurs facteurs peuvent influencer l'attachement des chaînes oligosaccharidiques à une protéine, incluant le nombre des sites de glycosylation de la protéine, la localisation spécifique de ces sites et l'expression spécifique des glycosyltransférases. Ainsi, une glycosylation différentielle considérable a lieu, permettant aux glycoprotéines de diversifier leurs structures et leurs fonctions par rapport aux protéines non glycosylées. Classiquement, la N-glycosylation des récepteurs permet de réguler l'expression des récepteurs à la surface de la cellule. Cependant, il devient de plus en plus clair que la glycosylation peut réguler la fonction du récepteur (Pang et al., 1999).

II. 9.2.6.1 La N-glycosylation et les PARs

Chacun des récepteurs possède des sites potentiels de N-glycosylation au niveau de leurs domaines extracellulaires (**tableau 7**). Chaque PAR possède un nombre différent de sites de N-glycosylation suggérant une glycosylation différentielle à travers la famille PAR. En plus il est particulièrement intéressant de noter qu'un site de N-glycosylation est situé au niveau du site de clivage/activation pour chacun des PAR (**tableau 7**).

PAR-2 humain (hPAR-2) possèdent deux sites de N-glycosylation, un au niveau de la deuxième boucle extracellulaire (ECL2) (N²²²I²²³T²²⁴) et le second du côté N-ter du récepteur (N³⁰R³¹S³²). hPAR-2 présente une masse comprise entre 45-100 kDa, dont 60 kDa peuvent être attribués à la N-glycosylation (Compton et al. 2002b). hPAR-2 est glycosylé au niveau des deux sites. Le site situé au niveau de N-terminus joue un rôle dans la régulation de la fonction du récepteur. En effet, on pu montrer que l'activation du récepteur par la tryptase est affectée par la sialylation (Compton et al., 2002).

II.10 La coloration de la robe chez le bovin

Depuis des siècles, les couleurs des robes bovines ont fasciné les hommes comme en témoignent les peintures de bovidés sur les parois de la grotte de Lascaux réalisées par nos ancêtres préhistoriques. C'est vers le XVIIème siècle que les sélectionneurs ont commencé à sélectionner les races bovines sur la base de leur couleur de robes plus ou moins uniformes ou tachetées, en tant qu'outil pour l'identification des races bovines.

La coloration des bovins, bien qu'en apparence secondaire du point de vue économique, a toujours passionné le monde des éleveurs. Il suffit, pour s'en convaincre, de constater l'importance qu'on lui attribue dans la vente des animaux, de suivre les jugements de reproducteurs dans les concours, de lire le luxe de détails concernant la pigmentation de la robe et des muqueuses dans les standards des races. Ainsi, une étude sur la coloration peut présenter l'intérêt de donner une description raisonnée des caractères des diverses races. Le choix d'une couleur de robe n'est d'ailleurs pas toujours sans influence sur le rendement économique car, à la lumière de diverses études de bioclimatique animale, il semblerait que certaines couleurs assurent mieux que d'autres une bonne adaptation des bovins à des conditions climatiques particulières (Lauvergne, 1966).

II. 10.1 Les patrons de coloration

Chez le bovin, il existe une grande diversité de la couleur de la robe (**figure 34**).



Figure 34 : Quelques patrons de la coloration de la robe chez le bovin.

La couleur des aurochs, l'ancêtre sauvage de la plupart des races de *Bos taurus*, semble être la couleur de référence (standard) la plus appropriée (Olson, 1999) des races bovines contemporaines. 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, les mâles étaient plus sombres, particulièrement au niveau de la tête, la nuque et la partie postérieure. La différence d'intensité de coloration entre les taureaux et les vaches au sein d'une même race est toujours d'actualité. En effet, pour un patron de coloration donné, les taureaux sont toujours plus pigmentés que les vaches. 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. Certaines races présentent une robe de couleur non uniforme, on parle alors de panachure. Elle consiste en la présence de taches blanches, avec une répartition et un contour souvent bien définis dans un pelage pigmenté noir (exemple Prim'Holstein), rouge (exemple Montbéliard, Maine-Anjou) ou dans un pelage pigmenté noir/marron et/ou noir/rouge (Normande). Ces tâches blanches sont généralement attribuées à une absence de mélanocytes. L'étude génétique a été faite de façon très précise chez la souris, dans la mesure où l'on a pu déterminer chez cette espèce la migration des mélanoblastes à partir de la crête neurale (Mayer, 1967; Mayer et Oddis, 1977; Rawles, 1947) et leur répartition au niveau de la peau pour chaque souche de souris (Mintz, 1967). Ces mélanoblastes peuvent être défectueux par eux-mêmes dès leur constitution dans la crête neurale ou bien rencontrer un milieu hostile auquel ils sont plus ou moins sensibles et qui s'oppose à leur développement ou à leur différenciation en mélanocyte.

II. 10.1.1 Le déterminisme génétique des patrons de coloration chez le bovin

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

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

supposés généralement sur la base des données acquises chez différentes espèces en particulier chez la souris, ont été proposés pour rendre compte des variations de coloration entre les races (**tableau 1**).

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>α^w</i>	White-bellied : perte du rouge et distribution plus uniforme du noir	Récessif	Brown Swiss
		<i>α^l</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 Simmental</i>	<i>Ds</i>	Dilution modérée du noir et du rouge	Dominance incomplète	Simmental
<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>	Hereford pattern/face, queue, pieds blancs	Dominance incomplète	Hereford
		<i>S^P</i>	Pinzgauer pattern / cotés pigmentées, zones blanches sur le dos et le ventre	Dominance incomplète	Pinzgauer
		<i>s</i>	Piebald : zones irrégulières pigmentées 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 pigmentées dans les parties blanches des mutants white-spotted	Dominant	Shorthorn

Tableau 1. Loci génétiques décrits chez le bovin, (Olson, 1999).

II. 10.1.1.1 Le locus *Extension*

Comme chez les autres espèces de mammifères le produit MC1R (récepteur aux mélanocortines 1) de ce locus est responsable à lui seul ou en combinaison avec d'autres allèles des gènes de coloration de la majeure partie des variations observées chez les races bovines. Les trois allèles identifiés à ce locus sont :

- *E⁺*, sauvage permettant toutes les combinaisons de rouge ou rouge/brun et de noir.
- *E^D*, responsable du noir dominant (communément appelé le facteur noir).

- e , exprimant le rouge récessif (communément appelé le facteur rouge)

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

L'allèle E^D (gain de fonction) 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 le phénotype noir observé chez les races Prim'Holstein (avec taches blanches) et Angus (sans taches blanches) à titre d'exemple (**figure 35**). L'allèle e (perte de fonction) se caractérise par la délétion d'une Guanine en position 310 de la partie codante et produit un récepteur tronqué, inactive par décalage du cadre de lecture (Joerg et al., 1996; Klungland et al., 1995). Cet allèle est retrouvé, entre autres, chez les races Limousine, Charolaise, Salers, Blonde d'Aquitaine, Main-Anjou, et Montbéliard.



Figure 35 : Phénotypes des robes des races Holstein, Angus et Aubrac.

Un quatrième allèle $E1$ (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 Gasconne et Aubrac (**figure 35**). La présence de l'allèle sauvage (E^+) est nécessaire mais pas toujours suffisant pour expliquer les couleurs de robes avec des combinaisons de rouge ou marron/rouge avec du noir. Les données moléculaires obtenues pour ce locus *extension* permettent de classer les races bovines françaises en deux familles. La série rouge est caractérisée par un génotype e/e avec des robes plutôt pheomélanique, allant du blanc crémeux de la Charolaise à l'acajou foncé de la Salers. La série noire avec des robes plutôt eumélanique et comportant des proportions variables de noir est le résultat de l'expression des allèles E , E^D et $E1$.

II. 10.1.1.2 Le locus *AGOUTI*

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que des mutations au locus *Agouti* seraient présentes chez le bovin (Adalsteinsson et al., 1995; Lauvergne, 1966; Searle, 1968; Olson et Willham, 1982). Cependant, la plupart de ces allèles ont été nommés en fonction des allèles connus chez d'autres espèces ayant un phénotype similaire à certaines races bovines. Par ailleurs, la nature et le rôle de tels mutants restent largement incompris. Le ventre plus clair de la Limousine et de la Jersey serait dû à un allèle a^i et les modifications du phénotype sauvage observé chez la Brown Swiss, la Brahman et la Chianina serait dues à un autre allèle (a^w). Adalsteinsson et ses collaborateurs (Adalsteinsson et al., 1995) ont présenté des éléments en faveur d'un allèle noir récessif (a), qui, à l'état homozygote, modifie le phénotype sauvage en un noir uniforme. L'allèle sauvage A permet l'expression de la combinaison de pigmentation rouge et noire du phénotype sauvage. L'homozygotie a/a n'a pas d'effet sur les animaux qui ont un génotype e/e ou $E^D/-$. Des allèles d'*Agouti* ayant les mêmes effets sont présents chez les souris, les chiens et les chevaux (Hustad et al., 1995; Rieder et al., 2001; Sato et al., 2005). La race étudiée par Adalsteinsson et ses collaborateurs (1995) est la race Islandaise et il y a à ce jour peu de preuves montrant que l'allèle a existe également chez d'autres races, d'autant plus que même chez l'Islandaise, cet allèle est peu fréquent.

II. 10.1.1.3 Le locus *Bringé* (Brindle)

Pour expliquer le phénotype bringé des races Normande et Texas Longhorn, un allèle Br a été proposé. 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. Celui-ci serait hypostatique sur les allèles E^D et e . En effet, 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 (1999). Les régions bringées sont celles qui auraient été marron foncées ou noires si l'allèle B^r 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^+ .

II. 10.1.1.4 Le locus *Albino*

Les cas d'albinisme semblent rares chez les bovins. L'animal albinos présente une dépigmentation totale à la fois au niveau de la peau, le pelage et les yeux. Les mutants au locus *Albino* (*c/c*) correspondant à des mutations affectant 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) et surtout ce genre d'individus déroge au standard des races. Schmutz et al. (Schmutz et al., 2004), ont décrit l'insertion d'une cytosine dans le gène de la tyrosinase engendrant l'apparition d'un codon stop prématuré chez un veau de race Brune (**figure 36**) et qui est responsable de son phénotype albinos.



Figure 36 : Veau albinos de race Brune
(<http://skyway.usask.ca/~schmutz/conditions.html>)

II. 10.1.1.5 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. Cet allèle hypothétique aurait donc un effet sur la coloration rouge, mais ne modifierait pas la coloration noire/brune des animaux porteurs.

II. 10.1.1.6 Le locus *Dilute*

Deux loci avaient été proposés pour rendre compte de la dilution du pelage observée chez les races Charolaise et Simmental. La Charolaise est porteuse de la mutation *Dilute* (*Dc*), qui éclaircit le pelage et la rend blanc/crème, à l'état homozygote. La race Simmental porteuse de la mutation présente aussi une dilution de sa coloration. Ces deux phénotypes avaient tendance à être distingués. Chez le bovin, Il a été démontré par des approches histologiques (Renieri et al. 1993) que la race charolaise porteuse de la mutation *Dc* est affectée dans la biogenèse du mélanosome. Plus précisément, les mélanosomes de la race Charolaise sont bloqués au stade pré-mélanosome (stade I). Ainsi 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.

II. 10.1.1.7 Les mutations *white-spotting*

Le white-spotting ou piebaldisme (Jackson, 1994) correspond à des zones blanches (dépigmentées), de tailles et de formes variables, combinées à la présence de zones pigmentées. Ce phénotype est certainement le plus caractéristique de certaines races bovines telles que la Prim'Holstein, la Montbéliarde, 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^+ (**tableau 1**). 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 (**figure 37**), 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. Il est responsable d'un phénotype pie très irrégulier et en proportion variable.



Figure 37 : Race Hereford porteuse de l'allèle S^H .

Une étude sur les proportions de blanc et de noir chez la race Prim'Holstein a 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 héréditaires (~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) (**tableau 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 (**figure 38**) 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.



Figure 38 : Phénotype Roan de la race Shorthorn

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 suffisante 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).

Le type de coloration Belted peut aussi être classifié comme un type de spotting très reconnaissable puisqu'il correspond à une ceinture blanche (**figure 39**) 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. 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* (Giuffra et al., 1999).



Figure 39 : Belted Galloway

Un locus majeur indépendant des autres locus white-spotting est appelé *Brockling* (Bc). 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 Bc . 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 Bc de l'Angus est présent. Les races qui semblent porter cet allèle Bc sont l'Ayshire, la Jersey, la rouge Norvégienne et la Normande. 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).

III. PROJET D'ETUDE

III.1 Contexte du projet

Le cheptel bovin français compte plus de 20 millions de têtes réparties en une quarantaine de races qui ont généralement une origine régionale bien identifiée et une couleur de robe souvent caractéristique, héritée du travail des premiers éleveurs sélectionneurs aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles.

Les récentes crises alimentaires en Europe ont suscité de nouvelles exigences chez les consommateurs en matière de caractérisation et de traçabilité des aliments qui lui sont proposés. La race d'origine du produit est une composante déterminante du cahier des charges, que l'éleveur veut garantir au consommateur. Le patron de coloration de la robe, des muqueuses et des phanères a joué un rôle déterminant dans l'histoire des races bovines : alors qu'une race bovine présente une variabilité des performances et du génome, elle est précisément décrite et fixée pour sa couleur, qui devient donc un élément caractéristique de l'appartenance raciale d'un animal, et des produits qui en dérivent.

Mon sujet de thèse s'intègre dans la thématique de recherche de marqueurs moléculaires spécifiques à chacune des races bovines françaises. Ce travail repose sur la mise à profit des allèles des gènes de coloration. L'objectif est de proposer des outils moléculaires appropriés pour une traçabilité raciale des populations bovines et de leurs produits dérivés.

III.2 L'état actuel de la thématique

Les travaux menés au sein de l'équipe gènes de coloration de l'UMR 1061 (INRA/université de Limoges) ont permis d'identifier à l'échelle moléculaire des allèles de trois loci exploitables pour la traçabilité des races bovines. Il s'agit des allèles du gène *Extension*, *Agouti* et *Silver*.

III.2.1 Le locus *Extension*

Quatre allèles (Rouzaud et al., 2000) ont été identifiés (**figure 40**).

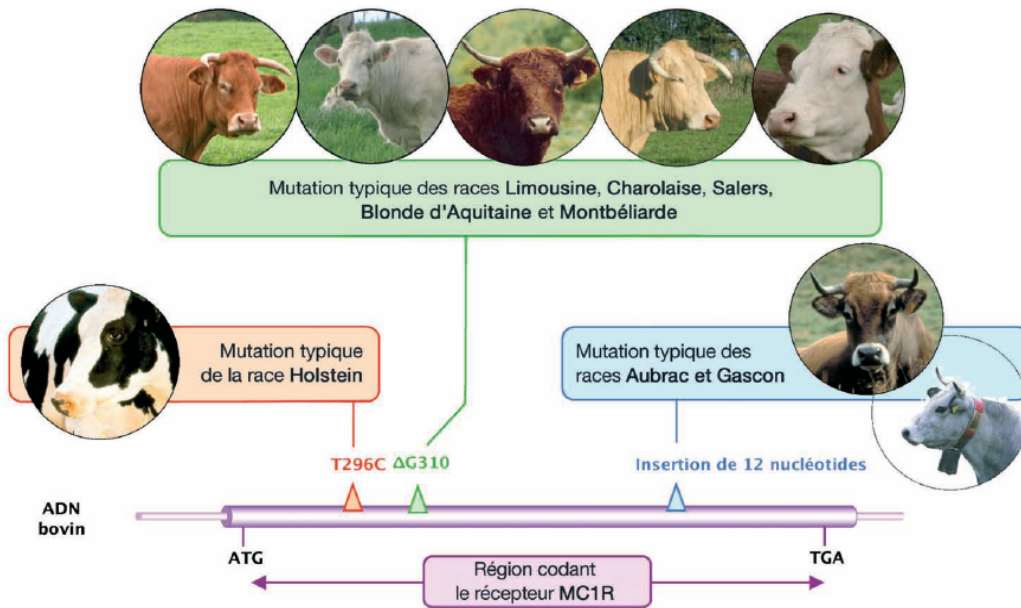


Figure 40. Allèles du gène *extension* impliqués dans différences de couleur de robe entre races ou groupes de races. Au total, quatre allèles du gène sont ainsi exploitables (E^+ , E^D , e , $E1$) (Oulmouden et al., 2005)

III. 2.2 Le locus *AGOUTI*

Les travaux qui ont été menés lors de la formation doctorale de Girardot M. ont permis d'identifier un réarrangement au niveau du promoteur du gène *Agouti* chez la race Normande (**figure 41**). Il s'agit de l'insertion d'un Line dont le promoteur est soumis à une régulation épigénétique. L'expression différentielle de cet allèle nommé A^{br} en interaction avec l'allèle sauvage (E^+) du gène *Extension* est responsable de la bringeure de la race Normande (Girardot et al., 2006). Aujourd'hui, A^{br} est le seul allèle en plus de l'allèle sauvage (A) qui a été identifié à l'échelle moléculaire chez le bovin.

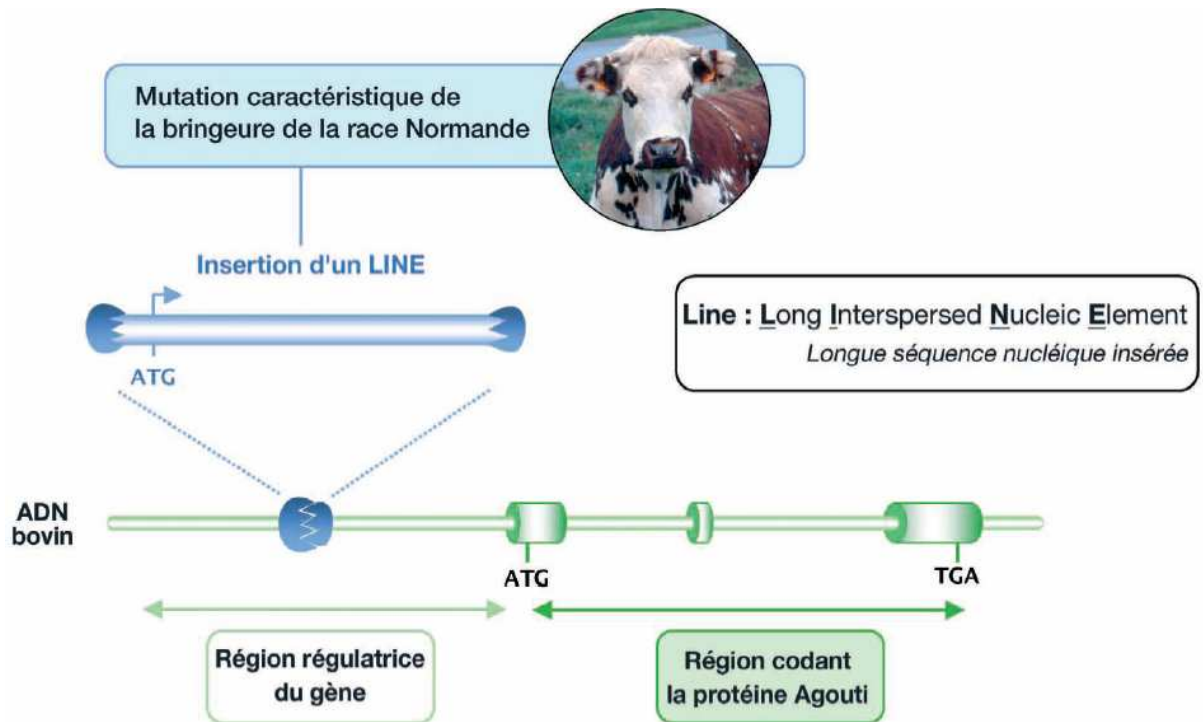


Figure 41 : Schéma de la structure de l'allèle A^{br} du gène *AGOUTI* de la race Normande.

III. 2.3 Le locus *SILVER*

Les allèles identifiés (Oulmouden et al., 2005) pour ce locus sont résumés dans la **figure 42**.

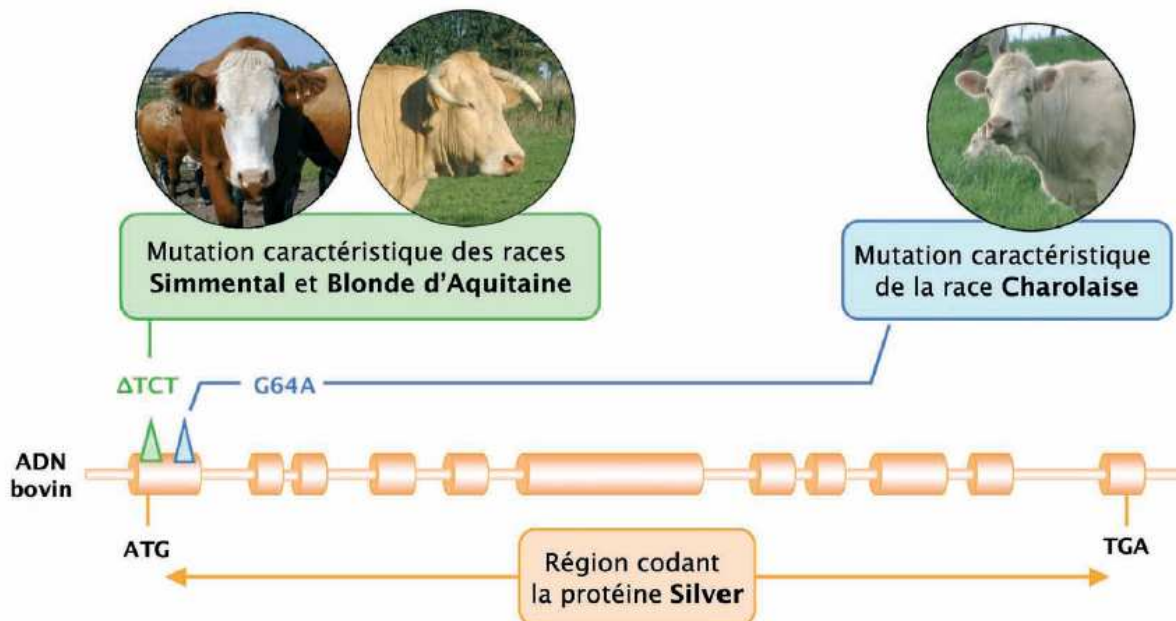


Figure 42 : Représentation schématique des trois allèles *SI* (sauvage), *si* et *si1* du gène *SILVER/PMEL17* bovin.

Les allèles *si*, *si1* affecte le peptide signal de la protéine *Silver*, avec une substitution d'une glycine par une Arginine, et la délétion d'une leucine respectivement. Même si la mutation charolaise est plus drastique les deux mutations affecteraient l'adressage correct de *Pmel17* au niveau du mélanosome ce qui expliquerait son blocage au stade prémélanosome (StadeI). Cette explication qui reste néanmoins à démontrer est en accord avec les données histologiques (Renieri et al., 1993) qui ont montré que la race charolaise ne possède que des mélanosomes immatures de stade I.

III.2.4 Exploitation des allèles identifiés pour la traçabilité bovine

Les connaissances relatives aux trois gènes *Extension*, *Silver* et *Agouti* permettent d'établir des combinaisons qui s'avèrent spécifiques de races ou groupe de races bovines (**tableau 2**). En exploitant les combinaisons alléliques des 3 gènes identifiés, huit races ou groupes de races bovines sont aujourd'hui identifiables avec des facteurs d'erreur minimales. Certaines d'entre elles le sont avec un seul variant (c'est le cas de la Charolaise ou de la Normande). D'autres ne le sont pas encore complètement malgré les 9 variants (allèles) de gènes exploités. La combinaison allélique reste la même pour deux races différentes (**tableau 2**).

Races bovines		Gène								Combinaison allélique	
		<i>Extension/MC1R</i>				<i>Silver</i>			<i>Agouti</i>		
		<i>E</i>	<i>E₁</i>	<i>E^p</i>	<i>e</i>	<i>SI</i>	<i>sī</i>	<i>si₁</i>	<i>A</i>		<i>A^{br}</i>
Viandes	Limousine				+	+			+		I
	Salers				+	+			+		I
	Charolaise				+		+		+		II
	Aubrac		+			+			+		III
	Gasconne		+			+			+		III
	Parthenaise	+				+			+		IV
	Blonde d'Aquitaine				+	+		+	+		V
Laitières	Simmental				+	+		+	+		V
	Prim'Holstein			+		+			+		VI
	Normande	+				+				+	VII
	Montbéliarde				+	+			+	+	VIII

Tableau 2 : Races et groupes de races bovines identifiables actuellement par des tests ADN basés sur la combinatoire des allèles des gènes de coloration *Extension*, *Silver* et *Agouti*.

III.3 Projet de thèse

Mon sujet de thèse s'intègre dans la thématique de recherche de marqueurs moléculaires spécifiques à chacune des races bovines françaises. Ce travail repose sur la mise à profit des allèles des gènes de coloration. L'objectif est de proposer des outils moléculaires supplémentaires appropriés pour une traçabilité raciale des populations bovines et de leurs produits dérivés.

Les données acquises lors de mon travail de thèse constituent une première contribution aux mécanismes moléculaires qui régissent la pigmentation cutanée chez le bovin. En effet jusqu'alors, mon équipe d'accueil s'est plutôt intéressé à identifier les allèles de gènes de coloration responsables des différents patrons de coloration de la robe bovine.

Même si l'essentiel des gènes sont communs aux deux systèmes pigmentaires (poils et peaux), certaines races bovines présentent une pigmentation cutanée et pileaire différentes. On retrouve la même situation chez l'homme contrairement à la souris dont la peau n'est pas pigmentée. Par conséquent, l'essentiel des données propres à la pigmentation de la peau chez les mammifères a été obtenu chez l'homme. Par ailleurs, il n'existe pas de mutant de la coloration cutanée chez la souris.

Chez l'homme on a pu montrer que le gène *PAR-2* joue un rôle crucial dans la coloration de la peau. Bien qu'aujourd'hui aucune association entre une coloration cutanée et un allèle du gène *PAR-2* n'ait été établie, il a été rapporté que l'expression de ce gène est corrélée au type de pigmentation cutanée.

L'essentiel de mon travail de thèse a consisté en l'étude du gène *PAR-2* chez le bovin. Plus particulièrement, j'ai abordé la recherche des allèles de ce gène et étudié son expression aussi bien au niveau transcriptomique que protéomique.

IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1 Matériel biologiques

A. Les échantillons de peaux

Les échantillons de la peau bovine ont été prélevés à l'abattoir de Limoges et auprès des UPRA (Unités Nationales de Sélection et de Promotion de Race) des races bovines étudiées. Les prélèvements de peaux (généralement 25 cm²) 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 ou congelés à -80°C si le traitement est plus tardif.

B. Les échantillons de sang.

Les échantillons de sang ont été fournis par les UPRA (Unités de promotion des Races Animales) et par les membres du projet TRACE des différentes races bovines étudiées. Ces échantillons de sang utilisés comme source d'ADN génomique bovin ont été récoltés dans des tubes contenant une solution anticoagulante. Les races utilisées dans cette étude sont la blanc bleu belge, la Blonde d' Aquitaine, Chianina, la brune Italienne, Italian Brown, Italian Friesian, Limousine, Maine Anjou, Maremmana, Marchigiana, Parthenaise, Piemontese, Pezzata Rossa italiana, Romagnola, Salers et la Charolaise.

C. Anticorps

Un anticorps monoclonal (SAMII) qui reconnaît les acides aminés 37-50 (SLIGKVDGTSHVTG) de l'extrémité N-terminale de PAR-2 humain (Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé. L'anticorps secondaire Chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (POD) (Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé. L'anticorps Actin sc-1615 (Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé pour l'aspect quantitatif relatif aux échantillons protéiques.

IV.2 Préparation d'acides nucléiques

A. Préparations d'ARN totaux de peau

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

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). Un ARN de 0,025 kb est présent dans tous les échantillons et permet de calibrer la migration.

B. Synthèse d'ADNc

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir de 1 µg d'ARN totaux de peau traités à la DNase, dans un volume final de 20 µl, avec 0,5 µg d'amorce oligo (dT) (Invitrogen) et la SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Life Technologies) conformément aux instructions du fabricant. La réaction est incubée 50 min à 42°C et ensuite 15 min à 70°C. Les ADNc sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Au total, des ADNc de trois animaux de chaque race ont été préparés. Ces ADNc sont utilisés pour la recherche de polymorphismes ainsi que pour les études d'expression du gène *PAR-2*.

C. Extraction d'ADN génomique bovin à partir de sang :

L'extraction et la purification de l'ADN génomique sont réalisées à partir de 5 ml de sang. La lyse des cellules est réalisée dans une solution hypotonique (Tampon de Lyse) NH₄Cl 150 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM (1/2,5 v/v), 40 minutes à 4°C suivie d'une centrifugation à 4°C 3500 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est enlevé et le culot est suspendu dans le tampon de lyse et centrifugé pour éliminer l'hémoglobine. Le culot est re-suspendu dans le tampon de TE. Les lymphocytes sont lysés en présence de l'EDTA 500 µl (pH 8), 250 µl SDS 20%, 50 µl de protéinase K à 20 mg/ml. Ce mélange est chauffé à 50°C pour une heure. Puis 4.3 ml NaCl saturé est ajouté au tube falcon suivi d'une agitation vigoureuse. Les tubes sont centrifugés 4000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant est transféré dans le tube stérile contenant de l'éthanol à 96% (4 fois le volume de l'échantillon). Il est mélangé doucement. L'ADN est récupéré par une pipette Pasteur stérile puis il est dissous dans 1ml de tampon TE. Sa concentration est estimée par mesure de l'absorbance 260 nm. La solution d'ADN ainsi obtenue est conservée à 4°C.

IV.3. Préparation des protéines

A. Extraction de protéines de peau

Les échantillons de peau sont traités soit frais, soit après conservation -80°C . Les poils sont rasés et le tissu adipeux sous-cutané est retiré. L'échantillon est ensuite découpé en morceaux d'environ 1 mm^2 , 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). Le broyat est soniqué. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min 12000g et le surnageant est récupéré et la concentration des protéines est mesurée. Les protéines sont ensuite stockées à -20°C .

B. Dosage des protéines

La concentration des protéines est réalisée grâce à la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le « BIO-RAD protein assay dye reagents » (BIO-RAD S.A., Allemagne). La BSA (Albumine Sérique Bovine) a été utilisée comme protéine standard. Une gamme étalon de BSA allant de 0 à $25\mu\text{g/ml}$ de protéines est réalisée dans de l'eau, dans un volume final de 1 ml. Les essais sont également dilués dans l'eau. Le réactif de Bradford est ajouté (1 ml) à chaque essai, avant agitation et lecture de l'absorbance à 595 nm. La concentration protéique de chaque échantillon est estimée par rapport à une gamme étalon constituée par BSA.

C. Traitement avec PNGase F

La PNGase F (Roche), également commercialisée sous le nom de Glycopeptidase F ou de N-Glycanase, hydrolyse la liaison amide existant entre le résidu asparagine d'une glycoprotéine et le N, N'-diacétyl-chitobiose de la structure commune à tous les oligosaccharides N-liés.

Les protéines sont placées dans un milieu réactionnel suivant :

- $60\mu\text{g}$ d'extrait protéique
- PNGase F $0,3\text{ U}/\mu\text{l}$.
- qsp $50\mu\text{l}$ PBS (pH 7, 5)

L'incubation est de 10 heures à 37°C . Après hydrolyse et concentration par précipitation, les échantillons sont séparés par PAGE, transférés et analysés en western blot.

Nom	Séquence
Bpar1	5'-CTCCAATCAGGGGCAGGCGGGAGGGTGGCT-3'
Bpar2	5'-GCGTCCGCCTCCCGCCCACGGCGCCCGAGA-3'
Bpar3	5'-CGCCGGGCTCCCCGTCCGCCC GGCGTCGGC-3'
Bpar4	5'-GAAACAAGTCTAAAGGAAGAAGCTTCATTG-3'
Bpar5	5'-TCACAGCGGGGTGCTTCTTCTTTGTTTCGGA-3'
Bpar6	5'-ATCGTTATCACATCCATGGCAACAACCTGG-3'
Bpar7	5'-ATCAGGTACATGGCCAGGACGGTGACAATG-3'
Bpar8	5'-TATACATGGTATGTGGTGAAACCTACTTGG-3'
Bpar9	5'-ACAGGGAAGCTTCCAGCAACCCTGAGAGGT-3'
Bpar10	5'-GCCGTTCTTTCTCTGAAGCGCTTGTGTTTG-3'
Bpar11	5'-GACAAGCCAGCATCTCTGTGGAAACACTGA-3'
Bpar12	5'-AGTAGTTAGCTTCCAGTGAGGACGGAGGT-3'
Bpar13	5'-GCCATGCCATTGCTTGGCAAACCAACCACG-3'
Bpar14	5'-TCCTGTCTCTGGCCATCGGAGTCTT-3'
Bpar15	5'-TCCATGGCAGAAGACTGGAGGGTCC-3'
Bpar16	5'-GGTACATGGCCAGGACGGTGACAAT-3'
Bpar17	5'-TGGCGTGATCCCTGAAGTCCTGTGA-3'
Parpur1	5'-GGTGGCTTCCCTACCCCTGCCGAGCGGCGAG-3'
Parpur2	5'ACTCAGTTTCGGGGCTGTGGTGGCGCCGGG3'
Parpur3	5'-TCACTAGTATGCGAAGCCCAGCGCGGCGTGGCTGCTC3'
Parpur4	5'-ACAACAGAAGCATCTCCGGAATGGTAAGCA-3'
Parpur5	5'-CTCCAAAACCTCCAGCAGAACTTCCACTGA-3'
Parpur6	5'-TAGGATCCTCAGTAGGAGCCTTTGACACTGGTTGAACT
Par2Dir	5'-CTCAGTCGTTTCGCTTCTGC-3'
Par2Rev	5'-CTTTCTTCCAGTTGTCTACACGATC-3'

Tableau 3 : Oligonucléotides utilisés pour le clonage, séquençage.

Nom	Séquence
PAR2-1 /2F	5'-CACCGTCCCAGGAAACAAGT-3'
PAR2-1/2R	5'-CCAGCGACCACAGGTGAGTT-3'
PAR2-2/2F	5'-CCATCCCCTTGTACGTCGTG-3'
PAR2-2/2R	5'-CATGTCTCCCACCAGCACCT-3'
GAPDH-QT1	5'-GTGAAGCAGGCGTCAGAGG-3'
GAPDH-QT2	5'-TTGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'

Tableau 4 : Oligonucleotides utilisés pour la RT-PCR semi quantitative.

IV.4. Méthodes relatives aux acides nucléiques

A. Réaction de PCR

La technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'amplification, selon un mode exponentiel, d'un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucleotidiques, capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence à amplifier, l'un avec le brin sens et l'autre avec le brin anti-sens. La taille des oligonucleotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18-30 bases (**tableaux 3, 4**).

Les PCR peuvent être réalisées dans un volume final de 10, 20 ou 50 μ l. Pour un volume final de 20 μ l, sont placés dans le tube 30 ng d'ADN en moyenne, 10 pmol de chaque oligonucleotide, 0,5 U de Taq polymérase en moyenne, 2 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de chaque desoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et enfin 1X de tampon fourni avec la Taq polymérase. La Taq polymérase utilisée dans ce travail de thèse est l'UptiTherm Taq Polymérase (Interchim). Jusqu'à 10% de DMSO peut être ajouté dans le cas d'amplification de régions riches en nucléotides GC.

La réaction classique est constituée de 3 étapes : une étape de dénaturation thermique (96°C, 3-4 min), une étape d'amplification de l'ADN pendant 35 cycles en moyenne (94°C, 30s pour la dénaturation thermique ; 55°C, 30s pour l'hybridation des amorces ; 72°C, 1 min pour élongation) et une étape de terminaison de la synthèse d'ADN (72°C, 5min). Ce programme peut-être modifié notamment en fonction des amorces utilisées (température d'hybridation), de la taille de l'amplifiat (temps d'élongation) et de la Taq polymérase utilisé (température d'élongation). La durée d'élongation dépend de la taille de PCR fragment prévu (30 secondes pour les petits fragments de moins de 1000 pb, 1 min pour 1000 pb, une augmentation de 1 min pour chaque 1000 pb).

B. RT-PCR semi quantitative :

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

Pour le gène d'intérêt (*PAR-2*), un couple d'oligonucléotides est choisi préférentiellement dans la région proche de la queue poly-A du transcrit d'intérêt (**tableau 4**). 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 100 M sont diluées à deux concentrations différentes : 7,5 M et 0,625 M. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl d'ADN à 5 ng/µl, de 12,5 µl de Mix SYBR Green et de 2 µl d'amorces sens et antisens à 0,625 µM (pour une concentration finale de 50 nM) ou de 1 et 3 µl d'amorces sens et antisens à 7,5 µM pour une concentration finale de respectivement 300 et 900 nM. Le volume est complété à 25 µl par addition d'eau RNase-free.

L'étape suivante consiste à vérifier la relation entre le nombre de cycles (*Ct*) nécessaire pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil et le logarithme de la concentration en ADN matrice. Cinq dilutions successives au 1/4 de l'ADN matrice sont réalisées. Pour une efficacité de PCR 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 anti sens 7,5 M (concentration finale de 300 nM), et de 0,5 µl d'eau RNase-free. Un gène calibrateur (*GAPDH*) est utilisé 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 au gène calibrateur. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux situations biologiques (*Prim'Holstein* et autres races) est obtenue par le calcul :

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

Des échantillons de peaux de trois individus par race ont été testés. Trois synthèses indépendantes d'ADNc ont été réalisées sur chaque échantillon de peau comme décrit précédemment. Chaque ADNc a été analysé en triplicat comme indiqué au début. Tous les résultats sont représentés en considérant la région noire de la *Prim'Holstein* comme référence biologique. 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 surexprimé quand son taux d'expression est supérieur à 2.

C. PCR-RFLP

La PCR a été effectuée avec les amorces PAR2-DIR et PAR2-REV (**tableau 3**) dans un volume total de 50 µl contenant, 100 ng d'ADN génomique, 5 µM de chaque amorce (2 µl), chaque dNTP à une concentration de 2 mM (5 µl), 5 µl de tampon 10x, MgCl₂ 25mM (3 µl) et 5 U/µl de Taq polymérase ADN (0,4 µl). L'ADN génomique a été dénaturé pendant 2 minutes à 94°C, suivi par 35 cycles de PCR : dénaturation à 94°C 30 secondes, annealing à 61°C pendant 30 secondes, élongation à 72°C pendant 1 min. Le produit de l'amplification est digéré soit par *HindIII* soit par *NlaIII* pendant 1h 30 min à 37°C. Les fragments d'ADN digérés sont séparés en gel d'agarose 2,5%.

D. Electrophorèse d'acides nucléiques et purification

a. Electrophorèse en gel d'agarose

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

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

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

E. Séquençage

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon le principe de la technique de Sanger ((Sanger et al., 1977) à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer). Les réactions de séquençage de produits purifiés après séparation sur gel d'agarose sont menées grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable. Elles nécessitent environ 200 à 400 ng de matrice, un mélange réactionnel commercial

(Terminator Ready Mix, PRISM Ready Reaction Ampli *Taq* FS, Perkin Elmer) contenant les dNTPs, les ddNTPs, le MgCl₂ et l'ADN polymérase (*Taq* FS) ainsi que 15 pmol d'amorce. Vingt-cinq cycles sont réalisés dans un volume final de 20 µL : dénaturation à 96°C 10 s, hybridation de l'amorce à 55°C 5 s et élongation à 60°C 4 min. l'ADN néosynthétisé est précipité par 80 µL d'isopropanol 75%, lavé par 250 µL d'isopropanol 75% afin d'éliminer les réactifs non utilisés qui pourraient perturber la migration, séché puis repris dans 20µL de TSR avant d'être dénaturé par traitement thermique à 96°C pendant 5 min.

IV.5. Méthodes microbiologiques et génétiques

A. Conditions de culture des bactéries

Les souches d'*E. coli* sont conservées à -80°C dans du glycérol (30% v /v final). Les cultures bactériennes sur milieu liquide (LB) sont réalisées à 37°C sous agitation à 250 rpm en Erlenmeyer ou pour de petits volumes dans des tubes à essais.

Milieu Luria-Bertani (LB)

Tryptone	10 g
Extrait autolytique de levure	5 g
NaCl	10 g
Eau distillée qsp	1l

Stérilisation 20 min à 120°C :

B. Antibiotiques

L'ampicilline est utilisée à 100 µg/ml à partir d'une solution mère à 10 mg/ml et conservé à 20°C. Cet antibiotique permet la sélection des plasmides qui portent le gène codant la *β-lactamase* et conférant la résistance à l'ampicilline.

La kanamycine est utilisée à une concentration de 34.5 µg/ml. La solution mère (34.5 µg/ml) est préparée dans de l'eau et conservée à -20°C.

Pour le test d'*α*- complémentation du gène *lacZ* chez *E.coli* le X-gal (1 mg dans 10 ml de DMF) est utilisé à 40 µg/ml en final.

C. Clonage de fragments d'ADN

Le clonage consiste à insérer un fragment d'ADN dans un vecteur qui est ensuite introduit dans une cellule hôte. Le clonage est composé de deux étapes : une étape de ligature (ligature de produits PCR ou de fragments d'ADN à extrémités cohésives) permettant l'introduction du fragment d'ADN dans un vecteur et une étape de transformation consistant en l'introduction du vecteur dans la cellule hôte. Pour le clonage 2 kits ont été utilisés soit TOPO TA ou TOPOXL (Invitrogen).

a. Ligature

La réaction de ligature dans le vecteur est réalisée pendant 5 minutes à température ambiante :

Tampon	1 μ l
Vecteur	1 μ l
Insert	1 μ l
H ₂ O	2 μ l

TOPOXL PCR cloning kit est utilisé pour cloner les fragments de 3 à 10 kb.

b. Transformation par choc thermique

Les bactéries dites compétentes ont subi un certain nombre de traitements chimiques qui les rendent particulièrement aptes à internaliser un acide nucléique étranger. Un aliquot de 50 μ l de bactéries compétentes est décongelé et additionné de 2 μ l du mélange de ligature. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 minutes. Le choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42°C. Après addition de 80 μ l de SOC le mélange est incubé une heure à 37°C sous agitation à 250 rpm (permettant l'expression du gène de résistance à l'ampicilline /kanamycine). Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu de culture LB solide contenant l'antibiotique (Ampicilline 100 μ g/ml ou Kanamycine 50 μ g/ml), permettant la sélection des bactéries transformées, du X-Gal pour la sélection des bactéries transformées par le vecteur porteur du fragment d'intérêt. Les clones apparaissent après 12 heures d'incubation à 37°C.

D. Mini préparation d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

L'ADN plasmique est purifié en petite quantité avec le kit 'High Pure Plasmid Isolation Kit' (Roche). Le principe de ce kit est basé sur une lyse alcaline suivie d'une rétention de l'ADN plasmique sur une résine échangeuse d'anions. L'ADN après purification est conservé à -20°C.

Une culture bactérienne (*E.coli*) d'une nuit de 3 ml est centrifugé à 4000 xg pour 30 secondes et le culot est repris dans 250 µl de tampon 1 de suspension (Tris-Hcl pH 8, 50 mM, EDTA 10 mM, RNase A 0,1 mg/ml). Ensuite les tubes sont vortexés pour bien suspendre le culot. Un volume de 250 µl de tampon de lyse (NaOH 0,2M, SDS 1%) est ajouté, mélangé par retournements successifs et abandonné 5 min à température ambiante. 350 µl de tampon de liaison (Hydrochloride de guanidine 4 M, acétate de potassium pH 4,2 0,5M) maintenu à 4°C sont ensuite ajoutés. Le mélange est incubé 5 min dans la glace puis centrifugé 10 min à 13000 xg. Le surnageant récupéré est déposé délicatement sur une colonne 'High Pure' et centrifugé 1 min à 13000 xg. La colonne est successivement lavée par 500 µl de tampon de lavage I (Tris-Hcl pH 6,6 20mM, Hydrochloride de guanidine 5 M, Ethanol 37,5%) et 750 µl de tampon de lavage II (tris-HCl pH 7,5 2 mM, NaCl 20mM, Éthanol 80%) et centrifugée 30 sec à 1 min à 13000 xg. L'ADN est élué en général par 50 à 100 µl de tampon d'éluion (Tris-Hcl pH 8,5 10 mM, EDTA 1 mM) et centrifugation de la colonne 1 min à 13000 xg. L'ADN est conservé à -20°C.

IV.6. Western Blot

A. Electrophorèse en gel Tris Glycine

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS/PAGE) permet la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur taille. Les gels utilisés dans le cadre de la thèse sont à 10%.

La séparation des protéines en fonction de leur taille est réalisée par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), selon la méthode de Laemmli. Le gel de séparation (stacking gel), dont la polymérisation commence dès l'addition de l'APS et du TEMED, est coulé entre deux plaques de verre et recouvert d'isobutanol saturé en eau. Ceci permet d'empêcher tout contact avec l'air qui inhibe la polymérisation. Dès que la polymérisation est complète, l'isobutanol est éliminé et la surface du gel est rincée. Le gel de concentration est alors coulé, et surmonté d'un peigne. Avant d'être déposés dans les puits ainsi formés, les échantillons protéiques dilués repris dans le tampon de charge sont dénaturés 96°C/ 5 min avant d'être déposés sur les gels SDS-PAGE.

B. Transfert actif sur membrane de nitrocellulose

Après séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE, le gel est démoulé et placé sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-c extra, Amersham). Trois papiers Wattman imbibé de tampon de transfert (Tris base 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0.0375% et Méthanol 20%) sont placés sous la membrane et sur le gel. Après le transfert, la membrane est colorée 10 minutes au rouge ponceau afin de vérifier que les protéines ont été correctement transférées, puis elle est abondamment rincée à H₂O mQ. La membrane est ensuite saturée TBST contenant 0,2% de lait pendant une heure à température ambiante sous agitation. Après la membrane est lavée deux fois avec TBST suivi par un lavage avec TBST-lait 0,2%.

C. Hybridation des anticorps et lavages

L'hybridation de l'anticorps primaire, diluée à une concentration adéquate dans du TBST-lait 0.2%, est conduite pendant toute une nuit 4°C. Le lendemain la membrane est lavée trois lavages au TBST-lait 0.2% pendant 5 min et ensuite l'anticorps secondaire, dilué dans du TBST-lait 0.2%, est incubé pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Enfin, la membrane est lavée 4 fois avec du TBST pendant 15 min à température ambiante et sous agitation.

D. Révélation

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

V. RESULTATS ET DISCUSSIONS

V. 1 Obtention de la région codante du transcrit du gène *PAR-2*

V. 1.1 Définition des amorces

La séquence nucléotidique du transcrit du gène *PAR-2* bovin est disponible dans les banques de données (Numéro d'accès : NM_001046283). A partir des informations fournies nous avons défini deux couples d'amorces (**tableau 3**) afin de réaliser une PCR gigogne pour amplifier la totalité de la partie codante (**figure 43**).

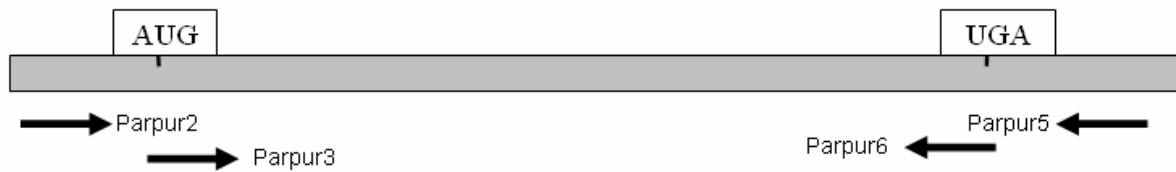


Figure 43 : Définition des amorces.

V. 1.2 Amplification par PCR et séquençage

Une amplification par PCR (**figure 44**) a été réalisée à l'aide du couple PCR Parpur3/Parpur6 (**tableau 3**) sur l'ADNc créé à partir d'ARNs totaux extraits de la peau (taches noires) d'un animal appartenant à la race Holstein. Nous avons considéré que les taches noires constituent un lieu sûr d'une bonne expression de la plupart sinon de tous les gènes impliqués dans la synthèse et la distribution des pigments au niveau du système tégumentaire.

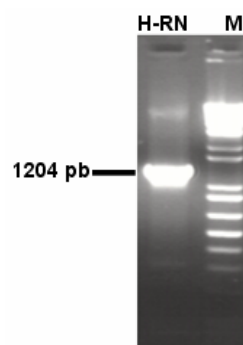


Figure 44 : Profil de l'électrophorèse en gel d'agarose de l'amplification PCR de la région codante du gène *PAR-2* chez la Holstein. H-RN : Holstein (région noire), M : marqueur de poids moléculaire (1 kb plus)

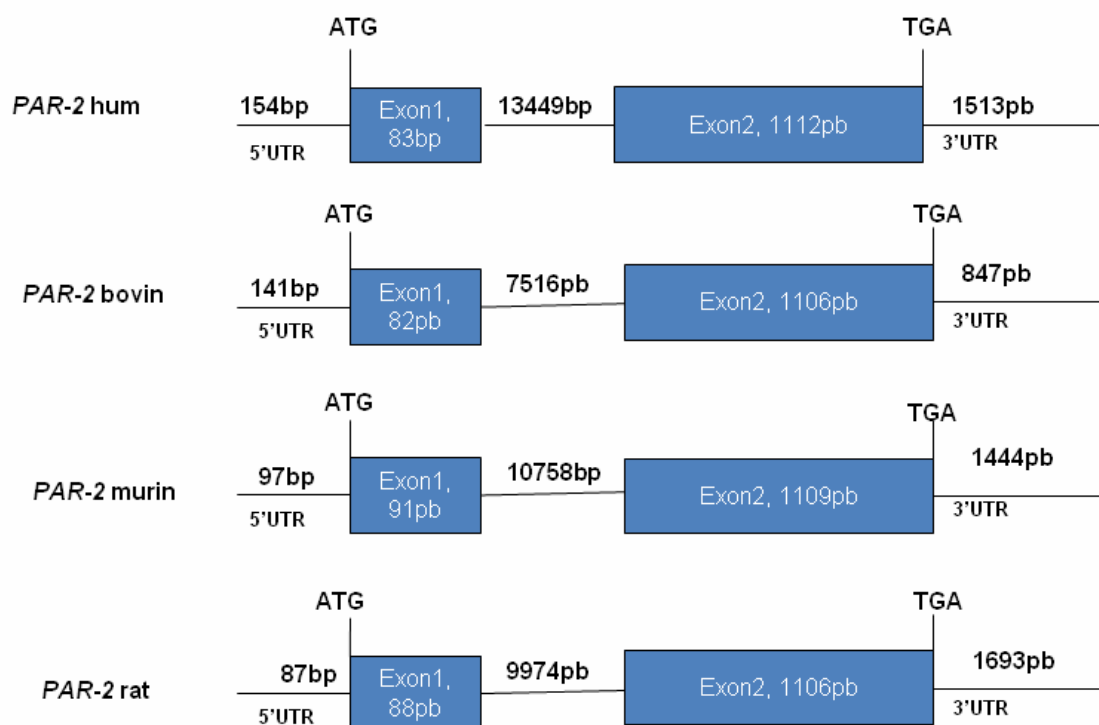


Figure 46 : Structure schématique du gène *PAR-2* chez le bovin, l’homme, la souris et le rat.

Bovin	100			
Human	85.2%	100		
Rat	80.1%	80.8%	100	
Souris	80.3%	82.3%	91%	100
	Bovin	Humain	Rat	Souris

Tableau 5 : Pourcentage d’identité entre les séquences codantes du gène *PAR-2*.

L'amplifiat obtenu à la taille attendue (1204 pb) a été ligaturé dans le vecteur TOPOXL avant transformation des bactéries compétentes et étalement sur milieu LB supplémenté en kanamycine. Les clones recombinants ont été criblés par PCR (**figure 45**) à l'aide des mêmes amorces (Papur3/Papur6) utilisées pour obtenir le fragment ainsi cloné.

Il est à noter que les amplifications sur ADNc de la plupart des gènes de coloration étudiés au laboratoire, nécessitent souvent l'usage d'une PCR gigogne. Dans le cas de *PAR-2*, une seule amplification PCR était suffisante.

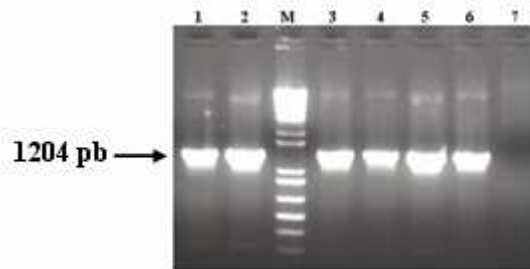


Figure 45 : Profil de l'électrophorèse en gel d'agarose du criblage par PCR de clones recombinants (1 à 7). Le clone 7 a été transformé par un vecteur sans insert. M : Marqueur de poids moléculaire (1 kb+).

L'ADN plasmidique de deux clones positifs a été préparé et l'insert séquencé par le couple d'amorces M13F, M13R du vecteur, ainsi que des amorces définies au sein de la région codante de la séquence disponible dans les banques de données (NM_001046283).

V.2 Structure de *PAR-2*

L'analyse de la région codante de *PAR-2* de la race Holstein pour les deux clones présente une identité parfaite avec celle déposée dans les banques des données (NM_001046283).

La structure du gène *PAR-2* bovin déduite du séquençage du génome bovin (**figure 46**) est similaire à celle décrite pour *PAR-2* chez l'homme, la souris et le rat. Il est constitué d'un court exon codant les 26 premiers acides aminés et d'un deuxième exon codant la majorité de la séquence peptidique du récepteur. Les deux exons sont séparés par une large séquence intronique. La taille des régions 5' et 3' UTR est indiquée dans la **figure 46**. Par ailleurs, la séquence nucléotidique du cadre de lecture ouvert de *PAR-2* est très conservée entre les différentes espèces (**tableau 5**).

V. 3 Le récepteur *PAR-2*

Le récepteur *PAR-2* bovin est codé par un cadre de lecture ouvert d'une taille de 1188 pb. La séquence peptidique déduite de ce dernier comporte 395 acides aminés.

M	R	S	P	S	A	A	W	L	L	G	G	V	L	L	L	A	A	18
ATG	CGA	AGC	CCG	AGC	GCG	GCG	TGG	CTG	CTC	GGG	GGC	GTC	CTC	CTG	CTG	GCG	GCC	54
S	G	S	C	N²³	R	T	V	P	G	N²⁹	K	S	K	G	R	S	L	36
TCT	GGC	TCC	TGC	AAC	CGC	ACC	GTC	CCA	GGA	AAC	AAG	TCT	AAA	GGA	AGA	AGC	CTC	108
I	G	N	V	D	N	S	P	V	V	A	G	R	G	V	T	V	K	54
ATT	GGT	AAC	GTG	GAT	AAC	TCA	CCT	GTG	GTC	GCT	GGC	AGA	GGC	GTG	ACA	GTG	AAA	162
P	G	F	S	V	D	E	F	S	T	S	V	L	T	G	K	L	T	72
CCA	GGC	TTT	TCC	GTG	GAT	GAG	TTT	TCT	ACC	TCC	GTC	CTC	ACT	GGA	AAG	CTA	ACT	216
T	V	F	L	P	V	V	Y	T	I	V	F	V	V	G	L	P	S	90
ACT	GTC	TTT	CTT	CCA	<u>GTG</u>	<u>GTC</u>	<u>TAC</u>	<u>ACG</u>	<u>ATC</u>	<u>GTA</u>	<u>TTC</u>	<u>GTG</u>	<u>GTT</u>	<u>GGT</u>	<u>TTG</u>	<u>CCA</u>	<u>AGC</u>	270
N	G	M	A	L	W	V	F	L	F	R	T	K	K	K	H	P	A	108
AAT	GGC	ATG	GCC	CTG	TGG	GTC	TTT	CTT	TTC	CGA	ACA	AAG	AAG	AAG	CAC	CCC	<u>GCT</u>	324
V	I	Y	M	A	N	L	A	L	A	D	L	L	S	V	T	W	F	126
GTG	ATT	TAC	ATG	GCC	AAC	CTG	GCC	TTG	GCC	GAC	CTC	CTG	TCG	GTT	ACG	TGG	TTC	378
P	L	K	I	A	Y	H	I	H	G	N	N	W	I	Y	G	E	S	144
CCT	TTG	AAG	ATC	GCT	TAT	CAC	ATC	CAT	GGC	AAC	AAC	TGG	ATT	TAC	GGG	GAG	TCT	432
L	C	K	V	L	I	G	F	F	Y	G	N	M	Y	C	S	I	L	162
CTT	TGC	AAG	<u>GTG</u>	<u>CTC</u>	<u>ATT</u>	<u>GGC</u>	<u>TTT</u>	<u>TTC</u>	<u>TAC</u>	<u>GGC</u>	<u>AAC</u>	<u>ATG</u>	<u>TAC</u>	<u>TGC</u>	<u>TCC</u>	<u>ATC</u>	<u>CTC</u>	486
F	M	T	C	L	S	V	Q	R	Y	W	V	I	V	N	P	M	V	180
TTC	ATG	ACC	TGC	CTT	AGC	GTG	CAG	AGA	TAC	TGG	GTC	ATC	GTG	AAC	CCC	ATG	GTG	540
H	P	K	K	Q	A	N	I	A	I	G	V	S	L	G	I	W	L	198
CAC	CCC	AAG	AAG	CAG	GCA	AAC	ATT	<u>GCC</u>	<u>ATC</u>	<u>GGC</u>	<u>GTC</u>	<u>TCT</u>	<u>CTG</u>	<u>GGA</u>	<u>ATA</u>	<u>TGG</u>	<u>CTG</u>	594
L	I	L	L	L	T	I	P	L	Y	V	V	K	Q	T	S	Y	I	216
CTC	ATT	CTG	CTG	CTT	ACC	ATC	CCC	TTG	TAC	GTC	GTG	AAG	CAG	ACC	TCC	TAC	ATC	648
R	A	L	N²²⁰	I	T	T	C	H	D	V	L	P	E	E	V	L	V	234
CGG	GCC	CTT	AAC	ATC	ACG	ACC	TGT	CAC	GAC	GTT	TTG	CCG	GAG	GAG	GTG	CTG	GTG	702
G	D	M	F	N	Y	F	L	S	L	A	I	G	V	F	L	F	P	252
GGA	GAC	ATG	TTC	AAT	TAC	TTC	CTG	TCT	<u>CTG</u>	<u>GCC</u>	<u>ATC</u>	<u>GGA</u>	<u>GTC</u>	<u>TTT</u>	<u>CTA</u>	<u>TTC</u>	<u>CCA</u>	756
A	F	L	T	A	S	A	Y	V	L	M	I	R	T	L	Q	S	S	270
GCC	TTC	CTC	ACG	GCC	TCG	GCC	TAT	GTG	CTC	ATG	<u>ATC</u>	CGG	ACC	CTC	CAG	TCT	TCT	810
A	M	D	E	S	S	G	K	K	R	R	R	A	I	K	L	I	V	288
GCC	ATG	GAT	GAG	AGC	TCA	GGA	AAG	AAG	AGG	CGG	AGG	GCC	ATC	AAG	<u>CTC</u>	<u>ATT</u>	<u>GTC</u>	864
T	V	L	A	M	Y	L	I	C	F	T	P	S	N	L	L	L	V	306
ACC	GTC	CTG	GCC	ATG	TAC	CTG	ATC	TGC	TTC	ACT	CCC	AGT	AAC	CTT	CTG	CTC	GTG	918
V	H	Y	F	L	I	K	T	R	G	Q	S	H	V	Y	A	L	Y	324
GTG	CAC	TAC	TTC	CTG	ATT	AAG	ACC	CGG	GGC	CAG	AGT	CAC	GTC	TAC	GCC	CTG	<u>TAC</u>	972
I	V	A	L	C	L	S	T	L	N	S	C	I	D	P	F	V	Y	342
ATC	GTG	GCC	CTC	TGC	CTC	TCC	ACC	CTC	AAC	AGC	<u>TGC</u>	<u>ATC</u>	<u>GAC</u>	<u>CCC</u>	<u>TTT</u>	<u>GTC</u>	<u>TAT</u>	1026
Y	F	I	S	Q	D	F	R	D	H	A	K	N	A	L	L	C	R	360
<u>TAC</u>	<u>TTC</u>	<u>ATT</u>	TCA	CAG	GAC	TTC	AGG	GAT	CAC	GCC	AAG	AAC	GCC	CTT	CTC	TGC	CGG	1080
S	V	R	T	V	K	R	M	Q	V	S	L	S	S	K	K	F	S	378
AGC	GTC	CGT	ACT	GTA	AAG	CGG	ATG	CAG	GTA	TCC	CTC	TCG	TCA	AAG	AAA	TTC	TCG	1134
G	K	S	S	S	Y	S	S	S	S	T	S	V	K	G	S	Y	*	395
GGG	AAA	TCC	AGC	TCT	TAC	TCT	TCA	AGT	TCA	ACC	AGT	GTC	AAA	GGC	TCC	TAC	TGA	1188

Figure 47 : Séquence nucléotidique du cadre de lecture ouvert codant les 395 acides aminés qui constituent le récepteur PAR-2 de la race bovine Holstein. Les sept domaines transmembranaires (TMD I, II, III, IV, V, VI, VII) sont soulignés. Le site de clivage par une serine protéase est également indiqué. Les 6 peptides ainsi démasqués et qui constituent l'agoniste du récepteur sont indiqués. Les sites potentiels de N-glycosylation ainsi que leur position sont en rouge.

La séquence peptidique de PAR-2 bovin est très conservée entre les différentes espèces (**tableau 6**). Il est à noter que PAR-2 bovin présente plus d'identité avec celui de l'homme.

Bovin	100			
Homme	86.1%	100		
Rat	82.4%	82.9%	100	
Souris	83.2%	83.5%	92.7%	100
	Bovin	Homme	Rat	Souris

Tableau 6 : Pourcentage d'identité des récepteurs PAR-2 bovin, humain, souris et rat.

PAR-2 bovin, comme ses orthologues chez les autres espèces, possède respectivement les extrémités N-terminale et C-terminale extracellulaire et cytosolique et sept domaines transmembranaires séparés par trois boucles externes et trois boucles internes.

Les sites potentiels de N-glycosylation décrits chez l'homme, la souris et le rat pour PAR-2 sont conservés chez le bovin. Les deux sites sont situés dans des positions critiques pour l'activation du récepteur. Le premier au niveau du site de clivage qui déclenche l'activation du récepteur et le second au niveau de la deuxième boucle extracellulaire qui interagit avec l'agoniste. En plus de ces sites conservés, PAR-2 bovin possède un site supplémentaire dans la région N-terminal (**figure 47 et tableau 7**).

	Bovin	Homme	Souris	Rat
N-terminale	N ²³ RT N ²⁹ KS	N ³⁰ RS	N ³³ NS	N ²³ RT
2 ^{ème} boucle extracellulaire	N ²²⁰ IT	N ²²² IT	N ²²⁴ IT	N ²²² IT

Tableau 7 : Position des sites potentiels de N-glycosylation.

Le récepteur PAR-2 bovin possède toutes les caractéristiques décrites pour ses orthologues humain et souris et, en particulier le peptide activateur du récepteur (**figure 47**). En effet, les quatre premiers acides aminés (**figure 48**) parmi les six résidus qui le constituent

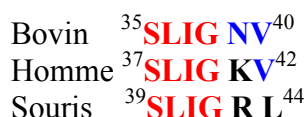


Figure 48 : Structure primaire du peptide activateur.

sont identiques, le cinquième est un acide aminé basique pour les trois espèces. Le sixième acide aminé, la valine, caractérise le peptide activateur chez le bovin et l'homme alors que la souris possède à cette même position un acide aminé hydrophobe, la leucine. Cette analyse comparative suggère que le récepteur PAR-2 bovin est activé voire régulé de façon similaire comme décrit chez l'homme et la souris.

V. 4 Recherche de polymorphisme du gène *PAR-2*

Chez l'homme, un polymorphisme du gène *PAR-2* a été décrit (Compton et al. 2000). Cette mutation affecte la deuxième boucle extracellulaire (**figure 49**) conduisant à une inhibition de l'activation de PAR-2. Cependant l'impact de cet allèle sur la pigmentation de la peau humaine n'a pas été abordé. Par ailleurs, aucune mutation n'a été décrite chez la souris pour ce gène.

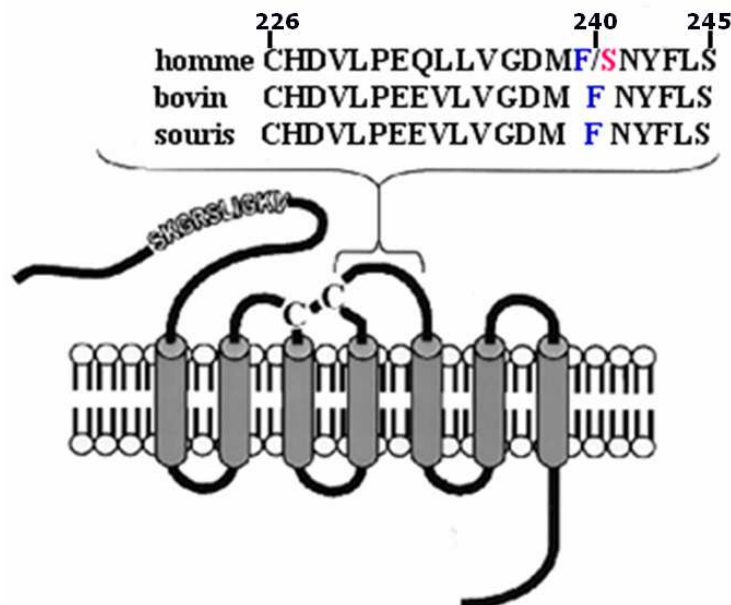


Figure 49 : Modèle du récepteur PAR-2.

Les nombres indiquent la position des acides aminés de la deuxième boucle extracellulaire de PAR-2 humain. La mutation identifiée chez l'homme correspond à la substitution de la phénylalanine (F) en une sérine (S). Ce modèle d'après Compton et al. 2000, a été modifié en ajoutant la séquence de la 2^{ème} boucle de PAR-2 bovine.

Bien qu'aucune association entre une pigmentation cutanée et un allèle *PAR-2* n'a été décrite, une corrélation entre son niveau d'expression et la coloration de la peau humaine a été démontrée : une peau noire présente une forte expression du gène *PAR-2*, alors qu'une peau blanche est associée à une faible expression de ce dernier (Babiarz-Magee et al., 2004).

Nous avons émis l'hypothèse que des variants éventuels de ce gène pourraient être associés à certaines colorations des peaux et/ou des robes chez le bovin.

Nous avons choisi de travailler dans un premier temps avec six races bovines (Holstein Parthenaise, Salers, Limousin, Blonde d'Aquitaine, Simmental) qui présentent des pigmentations cutanées différentes. Par ailleurs, certaines races possèdent une pigmentation cutanée différente de celle des poils de leur robe. C'est le cas notamment de la Parthenaise (race française) et de la Chianina (race italienne) qui présentent respectivement une robe rouge/peau légèrement noire et robe blanche/peau noire.

V. 4.1 Etude de la région codante

Nous avons choisi de séquencer la totalité de la région codante de *PAR-2* (1188 pb) d'un animal de chacune des races choisies pour détecter des polymorphismes éventuels.

V. 4.1.1 Amplification PCR de la région codante

Les régions codantes ont été amplifiées (**figure 50**) à l'aide du couple d'amorces parpur2/parpur5 (**tableau 3**).

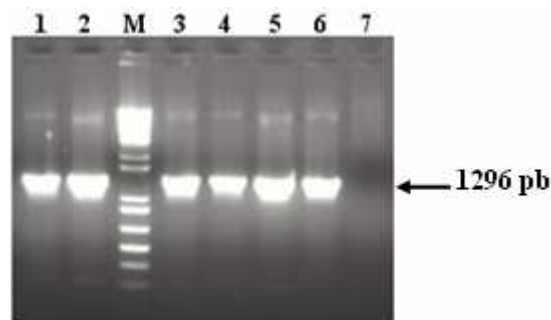


Figure 50 : Amplification de la partie codante du gène *PAR-2* à partir de cDNA.

1 : Holstein ; 2 : Parthenaise ; 3 : marqueur de poids moléculaire ; 4 : Salers ; 5 : Limousine ; 6 : Blonde d'Aquitaine ; 7 : Simmental ; 8 : témoin négatif sans ADN.

La taille attendue a été obtenue pour l'ensemble des animaux étudiés. Par ailleurs, l'usage d'une PCR nichée n'était pas nécessaire pour observer une bonne amplification dans chacun des cas (**figure 50**).

V. 4.1.2 Analyse des séquences et allèles identifiés

Nous avons obtenu par séquençage direct des amplifiats la structure primaire dans chacun des cas. La comparaison de l'ensemble des séquences a révélé l'existence d'au moins trois allèles *PAR-2* chez le bovin (**figure 51**).

PAR-2

```
91   TTC AAA GGA AGA AGC CTC ATT GGT AAC GTG GAT AAC TCA CCT GTG GTC GCT 141
31   S  K  G  R  S  L  I  G  N  V  D  N  S  P  V  V  A  47
```

par2.1

```
91   TTC AAA GGA AG A AGC TTC ATT GGT AAC GTG GAT AAC TCA CCT GTG GTC GCT 141
31   S  K  G  R  S  F  I  G  N  V  D  N  S  P  V  V  A  47
```

par2.2

```
91   TTC AAA GGA AGA AGC CTC ATG G GT AAC GTG GAT AAC TCA CCT GTG GTC GCT 141
31   S  K  G  R  S  L  M  G  N  V  D  N  S  P  V  V  A  47
```

↑ Site de clivage par l'endopeptidase

Figure 51 : Localisation au sein de la région codante des mutations *PAR-2* identifiées. Les substitutions de bases ainsi que les changements en acides aminés qu'elles engendrent sont indiqués en rouge. Les sites de restriction *HindIII* (AGCTT) et *NlaIII* (CATG) sont soulignés. Les six acides aminés du peptide activateur du récepteur sont indiqués en bleu. Les chiffres sont indiqués respectivement à partir de l'AUG et de la Méthionine.

Les trois allèles identifiés se distinguent par des substitutions au niveau du peptide activateur (**figure 51**). Nous n'avons pas identifié d'autres mutations au sein de la région codante pour l'ensemble des races étudiées.

A. L'allèle *PAR-2*

Nous avons considéré l'allèle *PAR-2* (**figure 51**) comme étant l'allèle standard car il possède les quatre premiers acides aminés du peptide activateur décrits pour *PAR-2* chez l'homme, la souris et le rat. Par ailleurs, la conservation de cette séquence peptidique entre les différentes espèces suggère que les acides aminés qui la composent sont déterminants dans l'activation du récepteur.

B. L'allèle *par2.1*

L'allèle *par2.1* se caractérise (**figure 51**) par rapport à l'allèle sauvage *PAR-2* par la substitution de la cytosine en position 106 par une thymine (C106T). Cette mutation C106T engendre le remplacement de la leucine (L) en position 36 par une phénylalanine (F). Ce changement L36F intervient au niveau du deuxième acide aminé conservé du peptide activateur du récepteur.

C. L'allèle *par2.2*

La mutation qui caractérise l'allèle *par2.2* affecte également la même région du récepteur. Il s'agit (**figure 51**) de la substitution de la thymine en position 111 par une Guanine (T111G). La mutation T111G engendre également une substitution d'un acide aminé en l'occurrence le remplacement d'une isoleucine en position 37 par une méthionine (I37M). Une fois de plus le changement affecte un des quatre premiers acides aminés conservés du peptide activateur.

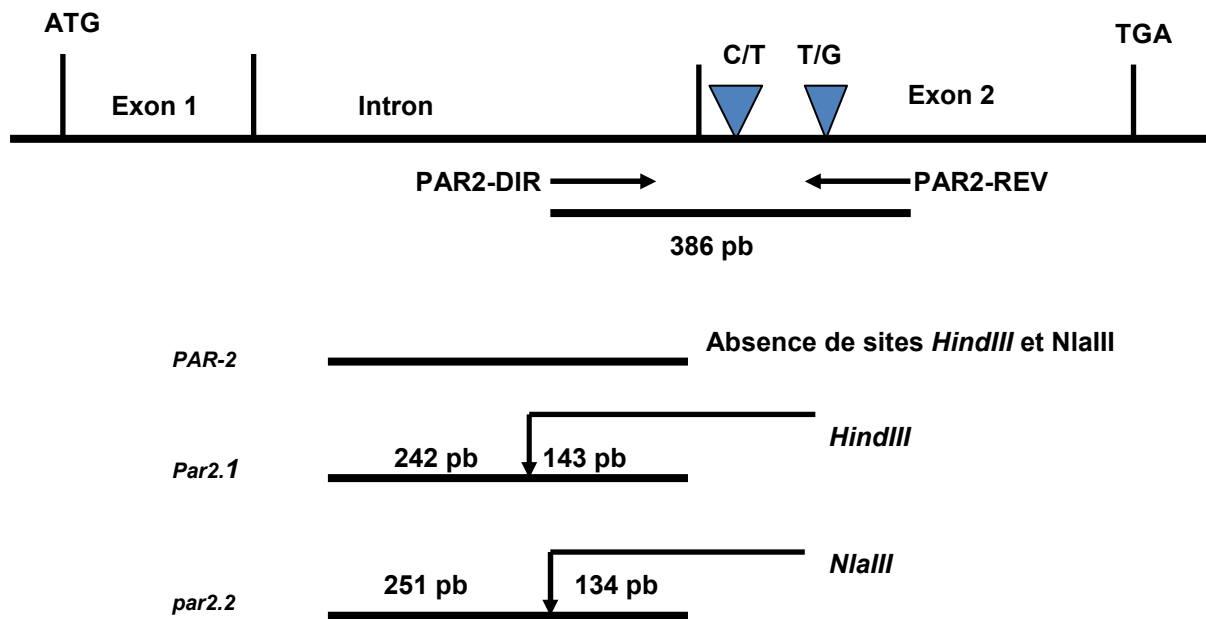


Figure 52 : Représentation schématique de l'approche PCR-RFLP utilisée.

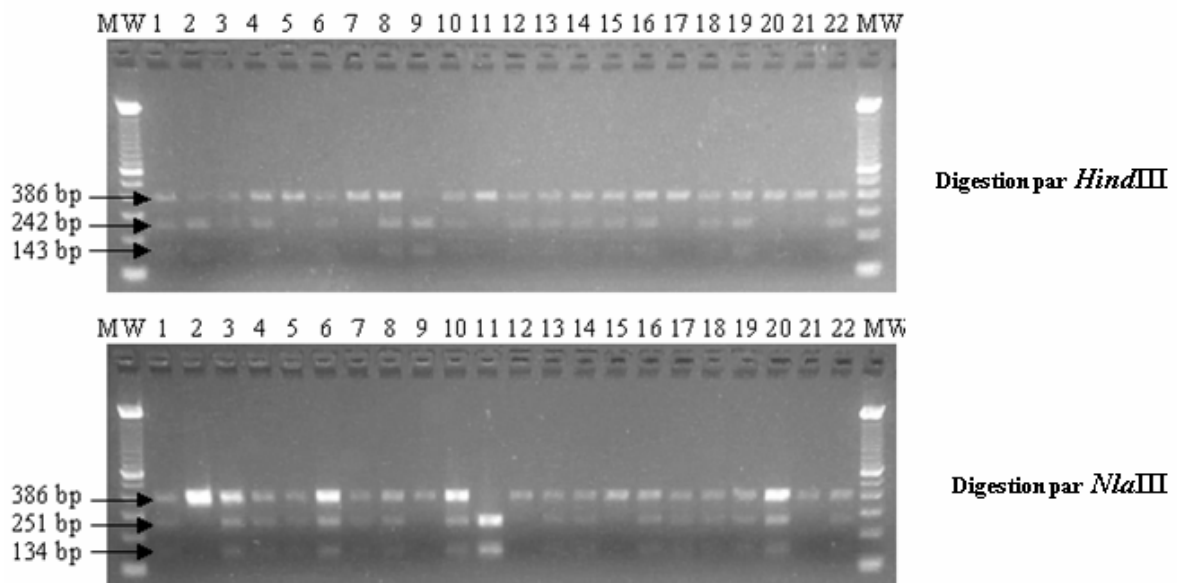


Figure 53 : Profil PCR-RFLP de l'électrophorèse en gel d'agarose obtenu par digestion *HindIII* ou *NlaIII*. 1 à 22: animaux appartenant à la race bovine Chianina.

Profil/génotype :

PAR-2/PAR-2: animal 21

PAR-2/par2.1: animaux 2, 12 et 15.

PAR-2/par2.2 : animaux 5, 7, 17 et 20

par.2.1/par2.1: animal 9

par2.2/par2.2 : animal 11

par2.1/par2.2 : animaux 1, 3, 4, 6, 8, 10, 13, 14, 16, 18, 19 et 22.

V. 5 Génotypage des allèles *PAR-2* bovin.

Nous avons entrepris le génotypage des trois allèles *PAR-2* au sein des populations bovines à l'aide de l'approche PCR-RFLP. En effet, les polymorphismes identifiés génèrent les sites pour les enzymes de restriction *Hind*III (allèle *par2.1*) et *Nla*III (allèle *par2.2*). Le produit d'amplification (386 pb) obtenu à l'aide du couple d'amorces PAR2-DIR/PAR2-REV et digéré par *Hind*III ou *Nla*III libère respectivement deux fragments de taille 242 pb et 143 pb ou 251 pb et 134 pb pour l'allèle *par2.1* et *par2.2* (**figure 52**). Le produit d'amplification (386 pb) correspondant à l'allèle *PAR-2* ne présente aucun des deux sites. Ainsi le profil d'électrophorèse en gel d'agarose des produits de digestion obtenus par l'une ou l'autre enzyme de restriction permet de génotyper les trois allèles *PAR-2* pour un animal donné. La **figure 53** présente le résultat type de l'approche utilisée pour le génotypage des allèles *PAR-2* des 22 animaux appartenant à de la race Chianina.

Nous avons ainsi génotypé 293 animaux appartenant à 14 races bovines avec des couleurs de robes et/ou de peaux différentes. Il est à souligner qu'une partie de ces génotypages a été réalisé par Olivier Fumière (Belgique) dans le cadre d'une collaboration au sein du projet européen TRACE dont nos deux équipes font partie.

La distribution des génotypes ainsi que la fréquence des allèles *PAR-2* dans les différentes races européennes étudiées sont présentés dans le **tableau 8**.

Race	Génotype Comptes						Total	Fréquences alléliques		
	<i>PAR-2/</i> <i>PAR-2</i>	<i>PAR-2/</i> <i>par2.1</i>	<i>PAR-2/</i> <i>par2.2</i>	<i>par2.1/</i> <i>par2.1</i>	<i>par2.1/</i> <i>par2.2</i>	<i>par2.2/</i> <i>par2.2</i>		<i>PAR-2</i>	<i>par2.1</i>	<i>par2.2</i>
Belgian Blanc Bleu	-	11	1	10	-	-	22	0.27	0.70	0.02
Blonde d'Aquitaine	7	8	2	3	-	-	20	0.60	0.35	0.05
Chianina	1	3	4	1	12	1	22	0.20	0.39	0.41
Italian Brown	1	1	-	19	1	-	22	0.07	0.91	0.02
Italian Friesian	1	10	-	11	-	-	22	0.27	0.73	0.00
Limousine	1	9	1	8	1	-	20	0.30	0.65	0.05
Maine Anjou	-	6	-	14	-	-	20	0.15	0.85	0.00
Maremmana	-	2	-	20	-	-	22	0.05	0.95	0.00
Marchigiana	2	8	-	9	3	-	22	0.27	0.66	0.07
Parthenaise	-	5	-	10	-	-	15	0.17	0.83	0.00
Piémontaise	1	10	1	10	-	-	22	0.30	0.68	0.02
Pezzata Rossa Italiana	1	7	-	14	-	-	22	0.20	0.80	0.00
Romagnola	6	9	-	7	-	-	22	0.48	0.52	0.00
Salers	3	5	3	9	-	-	20	0.35	0.58	0.08
	24	94	12	145	17	1	293	0.26	0.68	0.05

Tableau 8. Fréquences des allèles *PAR-2*, *par2.1* et *par2.2* dans les différentes races bovines européennes.

Il ressort de cette étude que le génotype le plus fréquent pour l'ensemble des échantillons analysés est *par2.1/par2.1* ($145/293 = 49,5\%$) suivi par le génotype hétérozygote *PAR-2/par2.1* ($94/293 = 32\%$). Trois autres génotypes sont présents à une fréquence $\leq 10\%$ et un génotype *par2.2/par2.2* a été détecté pour un seul animal appartenant à la race Chianina. Il existe une variation considérable de la fréquence des allèles parmi les races comme on peut le voir à partir des trois dernières colonnes du tableau. Sept races présentent une ségrégation des trois allèles, alors que pour six autres, l'allèle *par2.2* n'a pas été détecté. L'allèle *par2.1* est le plus fréquent (en moyenne 0,68%). Sa fréquence varie entre 0,35 et 0,95%. L'allèle *PAR-2* est présent à une fréquence totale de 0,26. Elle varie de 0,07 (la race brune Italienne) à 0,60 (dans la blonde d'Aquitaine). L'allèle *par2.2* est le plus rare (0,05 en moyenne), mais il atteint une fréquence de 0,41 dans la race Chianina, qui par ailleurs présente le seul animal de génotype *par2.2/par2.2*. Les races qui montrent des fréquences alléliques extrêmes sont la blonde d'Aquitaine (avec une fréquence maximum en allèle *PAR-2*) Maremmana (avec une fréquence maximum en allèle *par2.1*), et Chianina (avec une fréquence maximum en allèle *par2.2*).

Il est généralement admis que l'allèle standard en l'occurrence *PAR-2* que nous avons considéré comme étant sauvage est le plus représenté. Dans le cas présent, c'est l'allèle *par2.1* qui est le plus représenté.

Dans l'épiderme, *PAR-2* exerce un rôle régulateur sur la pigmentation de la peau, et la modulation de son activité peut augmenter ou diminuer la pigmentation. (Paine et al., 2001; Seiberg, 2001; Seiberg et al., 2000a, 2000b). Chez l'homme, *PAR-2* est plus actif au niveau des peaux noires (Babiarz-Magee et al., 2004), et le niveau de la protéine *PAR-2* est élevé au niveau de la peau humaine sous l'action des UVs (Scott et al., 2001), suggérant le rôle de *PAR-2* dans la pigmentation constitutive et facultative de la peau.

Le mécanisme d'activation de *PAR-2* a été particulièrement étudié en utilisant de courts peptides modifiés dérivés du ligand naturel SLIGRL. Ainsi, on a pu démontrer que ce dernier active mieux *PAR-2* que SLIGR (Hollenberg et al., 1996), que la leucine et l'arginine en position 2 et 5 de la séquence $S^1L^2I^3G^4R^5L^6$ sont importants (Al-Ani et al., 1999; Hollenberg et al., 1996) et que le dipeptide S^1L^2 , joue un rôle majeur dans l'activation de *PAR-2* (Al-Ani et al., 2004).

Bien que le variant *Par-2.1* se caractérise par la substitution de la leucine en position 2 du peptide par une phénylalanine, nous n'avons pas trouvé d'association stricte entre cet allèle et une pigmentation cutanée et/ou de la robe chez le bovin. Par ailleurs l'allèle *par2.2* ségrége également dans nombre des races étudiées.

Une des explications que l'on peut donner à cette observation est que les races étudiées portent également d'autres allèles de gènes de coloration dont l'effet est épistatique sur l'impact des allèles *PAR-2*. On peut également suggérer que les variants par2.1 et par2.2 n'induisent pas une inhibition majeure de l'activation du récepteur. Dans cet ordre d'idées, nous avons comparé (**figure 54**) les peptides activateurs des allèles identifiés avec ceux des autres membres de la famille PARs bovin disponibles dans la banque de données ainsi que leurs orthologues humains (<http://www.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de?>).

par2.2	SL M GNV
par2.1	SF I GNV
bPAR-2	SL I GNV
hPAR-2	SL I GKV
bPAR-1	SF F LRN
hPAR-1	SF L LRN
bPAR-3	TF R GAP
hPAR-3	TF R GAP

Figure 54 : Comparaison des peptides activateurs.

par2.1 et par2.2, les variants de PAR-2 identifiés chez le bovin.

bPAR : PAR bovin ; hPAR : PAR humain. Les substitutions qui caractérisent les deux variants par2.1 et par2.2 sont en rouge.

Quelque soit le peptide, on peut constater que le premier acide aminé est polaire (sérine ou thréonine) et le deuxième est un acide aminé hydrophobe (leucine ou phénylalanine). Cette constatation est en accord avec les travaux qui ont montré que les deux premiers acides jouent un rôle majeur dans l'activation de PAR-2 (Al-Ani et al., 2004) et probablement pour les autres récepteurs. Par ailleurs, cette comparaison suggère que le variant par2.1 n'affecte pas l'activation du récepteur. En effet il s'agit de la substitution d'un acide hydrophobe (leucine) par une phénylalanine (F) qui est par ailleurs à la même position aux niveaux des peptides activateurs de PAR-1 et PAR-3 (**figure 54**). Le même raisonnement peut être tenu pour le variant Par-2.2 dans la mesure où la substitution correspond à un acide aminé hydrophobe (**figure 54**). Néanmoins, ces observations restent à confirmer expérimentalement.

V. 6 Analyse de l'expression du gène *PAR-2* au niveau de la peau

N'ayant pas identifié d'association entre l'un des trois allèles identifiés et une pigmentation donnée chez le bovin, nous avons entrepris l'analyse de l'expression de *PAR-2* au niveau de la peau bovine. Nous avons choisi de travailler sur des échantillons de peaux des races bovines Holstein (région noire), Parthenaise, Salers, Limousine et Charolaise (**figure 55**). Ces races bovines présentent respectivement une pigmentation cutanée noire, légèrement noire, rouge acajou, froment, et blanche (**figure 55 B**).

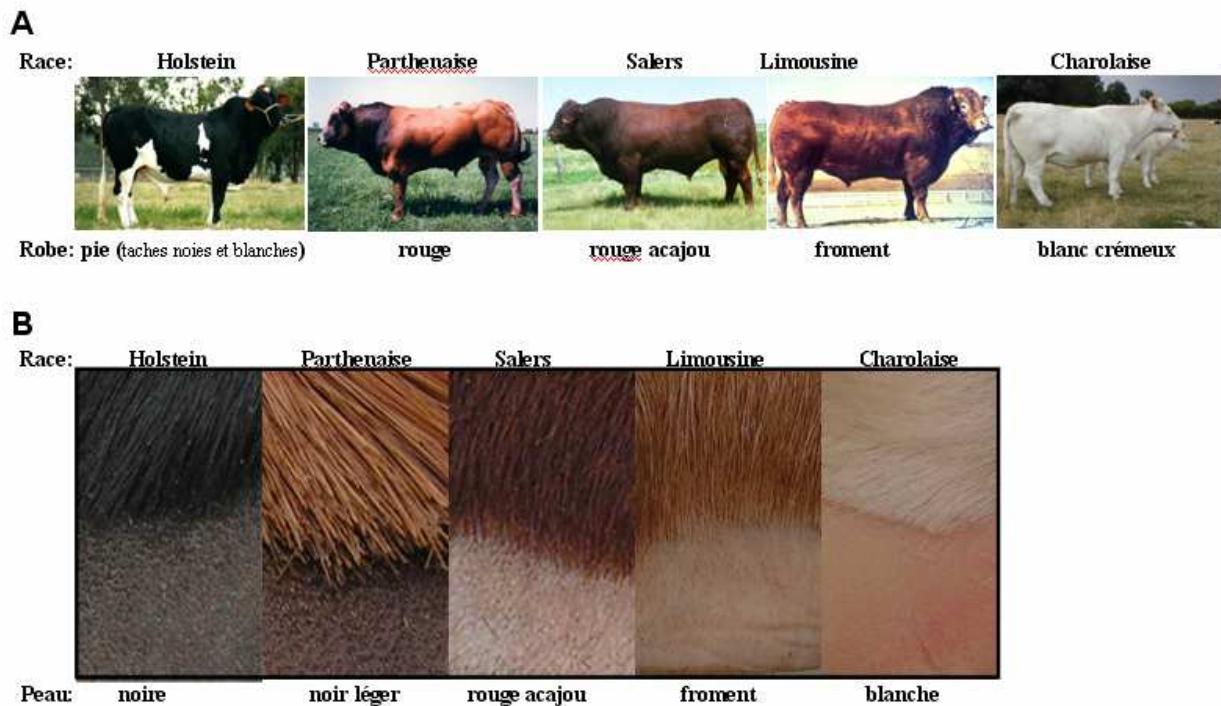


Figure 55 : Coloration de la robe (A) et de la peau (B) des races étudiées.

Les races choisies permettraient de voir s'il existe une corrélation entre l'expression de *PAR-2* et le type de pigment de la peau cutané chez le bovin comme décrit chez l'homme (Babiarz-Magee et al., 2004).

V. 6.1 Analyse de l'expression du gène *PAR-2* par PCR

L'expression de *PAR-2* au niveau de la peau a été examinée dans un premier temps sous un angle présence/absence par amplification des transcrits chez les différentes races étudiées. Les amorces utilisées sont celles permettant l'amplification de la partie codante. L'expérience a été réalisée sur des ADNc correspondant à des ARN totaux préparés à partir d'échantillons de peaux de trois animaux pour chacune des races (**figure 56**).

Nous avons obtenu un amplifiât à la taille attendue pour chacun des animaux. Par ailleurs, l'intensité similaire des bandes suggère que le gène *PAR-2* s'exprime à un niveau similaire dans tous les échantillons indépendamment de leur couleur de peau (**figure 53**).

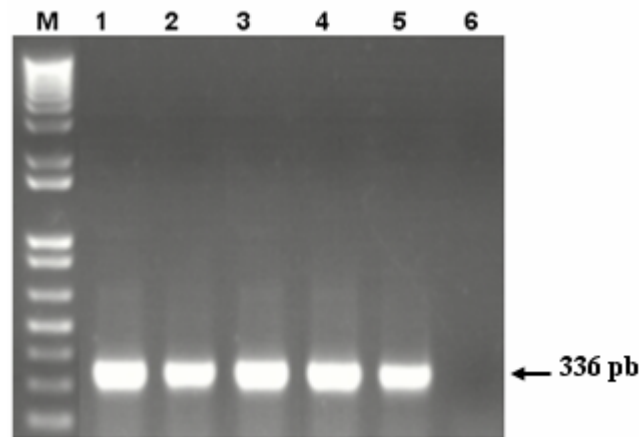


Figure 56 : Amplification PCR à l'aide des amorces Parpur3/Bpar5 sur des ADNc correspondants aux ARNs extraits des échantillons de peaux.

1 : Holstein (tache noire) ; 2 : Parthenaise; 3 : Salers; 4 : Limousine ; 5 : Charolaise.
6 : contrôle négatif d'amplification ; M : marqueur de tailles (1Kb plus).

V. 6.2 Etude de l'expression du gène *PAR-2* par RT-PCR semi quantitative

Afin d'affiner ces détections d'expression, nous avons entrepris une démarche de RT-PCR semi quantitative.

A. Définition des amorces

Les couples d'amorces utilisés en RT-PCR semi quantitative doivent répondre à un certain nombre d'exigences. La longueur et le T_m optimum de celles-ci sont de 20 bases et 59°C , respectivement. Les possibilités de repliement des amorces sur elles-mêmes et d'appariement entre elles doivent aussi être contrôlées. Tous ces paramètres sont intégrés dans le programme PrimerExpress™ qui nous a permis de déterminer des couples d'amorces optimaux. Deux couples d'amorces ont été ainsi définies (**tableau 4**).

B. Niveaux d'expression de *PAR-2*

Le niveau d'expression de *PAR-2* a été mesuré par RT-PCR semi quantitative. Les calculs se font comparativement à une référence, la partie noire de la Holstein, qui représente alors un taux d'expression de 1. Cet échantillon est pris en référence car nous considérons qu'il représente un niveau d'expression maximale de *PAR-2* de part sa pigmentation noire.

Nous n'avons observé aucune variation d'expression du gène *PAR-2* en fonction de la pigmentation de la peau des animaux. Ces résultats montrent que l'expression de *PAR-2* chez le bovin n'est pas associée à une pigmentation cutanée donnée, contrairement aux données rapportées et qui montrent une stricte corrélation entre l'expression de ce gène et la pigmentation de la peau humaine (Babiarz-Magee et al., 2004).

V. 7 Détection de la protéine PAR-2

Bien que nous n'ayons pas trouvé de corrélation entre le niveau d'expression du gène *PAR-2* et la pigmentation de la peau bovine, nous avons tenté l'identification d'une éventuelle association à une régulation post-transcriptionnelle. Pour se faire, nous avons entrepris une étude protéique par western blot en utilisant un anticorps monoclonal murin dirigé contre un peptide (résidus 37 à 50) de la partie N-terminale du récepteur PAR-2 humain (Bohm et al., 1996a)

V. 7.1 Etude de la protéine chez la race Holstein.

Nous avons dans un premier temps utilisé des échantillons de peau (taches noires) de la race Holstein pour valider la détection de la protéine par l'anticorps murin. Le choix de la Holstein se justifie par le fait que les peaux noires, en l'occurrence les taches noires chez cette race, devraient exprimer fortement la protéine.

Le premier résultat que nous avons obtenu en fonction de la quantité de protéines utilisée est présenté dans la **figure 54**.

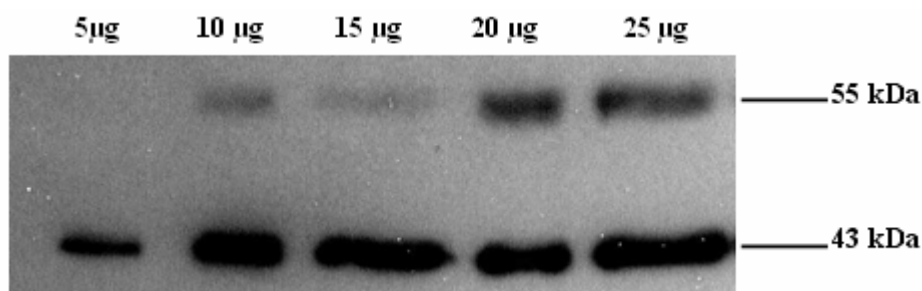


Figure 57 : Détection de la protéine PAR-2 par western blot en fonction de la quantité de protéines.

On observe la détection de deux bandes par western blot, l'une à 55 kDa et la deuxième à 43 kDa. Cette dernière correspond à la taille déduite de la structure primaire de PAR-2 (395 acides aminés). Elle est détectable à partir de 5µg de protéines. La deuxième bande s'observe à partir de 10 µg de protéines. Il correspondrait à une forme glycosylée du

récepteur. Il est à noter que plusieurs contrôles négatifs ont été effectués. En particulier, le western blot réalisé avec l'anticorps secondaire seul ne révèle aucune bande.

V. 7.1.1 Traitement à la PNGase

PAR-2 bovin possède trois sites potentiels de N-glycosylation (**figure 47, tableau 7**). Il a été montré in vitro que PAR-2 humain possède une masse de 45 à 100 kDa dont 60 kDa sont attribués à la N-glycosylation (Compton, 2003).

Nous avons refait une analyse par western blot des mêmes extraits protéiques (**figure 57**) après traitement à la PNGase pour voir si la bande à 55 kDa correspond à une modification post-traductionnelle relative à une N-glycosylation. Si c'était le cas on ne détecterait qu'une seule bande à 43 kDa. Le résultat obtenu est présenté **figure 58**.

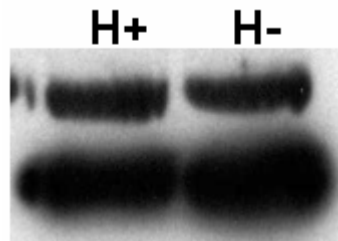


Figure 58 : Profil du western blot obtenu pour deux échantillons Traités (H+) et non traités (H-) à la PNGase.

Le traitement à la PNGase n'a pas modifié le profil du western blot ; on détecte toujours les deux bandes : ce n'était pas une forme N-glycosylé de PAR-2.

Bien que seule la N-glycosylation ait été décrite pour PAR-2 (Compton et al., 2002), une O-glycosylation qui expliquerait la bande détectée (55 kDa) n'est pas à exclure. Une autre possibilité est que l'anticorps utilisé reconnaisse également une autre protéine chez le bovin.

V 7.1.2 Détection de PAR-2 dans d'autres tissus que la peau

Chez l'homme et la souris, il est bien établi que PAR-2 s'exprime dans divers tissus en dehors de la peau.

Nous avons entrepris la détection de PAR-2 dans d'autres tissus bovins afin de voir si l'anticorps détecte également les deux protéines.

Nous avons analysé divers tissus des races bovines Limousine, Holstein (**figure 59**) et Normande (**figure 60**). La peau (Holstein tache noire) a été utilisée comme contrôle. Les résultats obtenus par western sont représentés dans les figures (**59 et 60**).

Parmi tous les tissus que nous avons étudiés et qui présentent une détection en western, une seule bande est observée en l'occurrence celle de 43 kDa. Le western ne révèle pas la deuxième bande (55 kDa) présente au niveau de la peau. Ces données suggèrent que l'anticorps que nous avons utilisé reconnaît une autre protéine exprimée spécifiquement au niveau de la peau par rapport aux autres tissus étudiés. Par ailleurs, le bovin semble se caractériser par une expression de PAR-2 plus restreinte que chez l'homme et la souris. En effet, nous avons observé une expression de PAR-2 uniquement au niveau du foie et du rein.

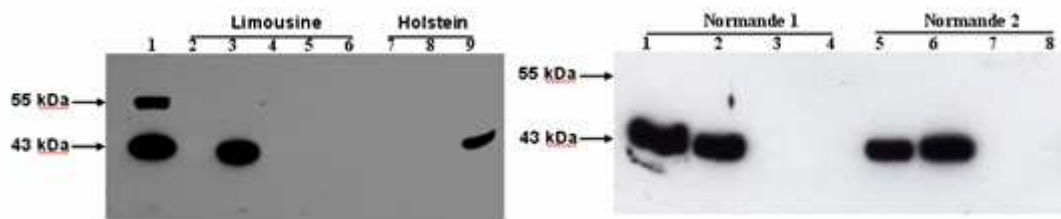


Figure 59 : Profil du western blot
 1 : Peau Holstein (tache noire);
 2 : colon ; 3 : foie ; 4 : cœur ;
 5 : poumon ; 6 : rate ; 7 : poumon ;
 8 : cœur ; 9 : foie

Figure 60 : Profil du western blot
 1 : foie ; 2 : rein ; 3 : poumon ; 4 : cœur ;
 5 : foie ; 6 : rein ; 7 : poumon ; 8 : cœur.

L'ensemble de ces données suggère que l'anticorps permet de détecter le récepteur PAR-2 à une taille attendue. Par ailleurs ces résultats montrent que PAR-2 est assez bien exprimé au niveau d'une peau noire chez le bovin comme d'ailleurs le gène *PAR-2* correspondant. En plus, l'expression de PAR-2 au niveau du rein et du foie ne semble pas dépendre de la couleur de la peau de l'animal au moins pour les cas étudiés (Holstein, Limousine).

V. 8 Etude de PAR-2 au niveau de la peau de différentes races.

Bien que l'expression de *PAR-2* au niveau du foie et du rein ne dépend pas de la couleur de peau de l'animal, nous avons néanmoins entrepris une analyse par western blot d'échantillons de peaux préparés à partir des différentes races étudiées en utilisant le même anticorps.

Un premier essai a été effectué avec 5 µg de protéines. Seul, l'extrait correspondant à la tache noire de la race Holstein présentait une bande à 43 kDa, résultat identique à celui présenté dans la **figure 57**. Après plusieurs essais en fonction de la quantité de protéines, ce n'est qu'à partir de 50 µg que l'on peut observer un signal par western blot correspondant à PAR-2 pour les autres races étudiées (**figure 61**).

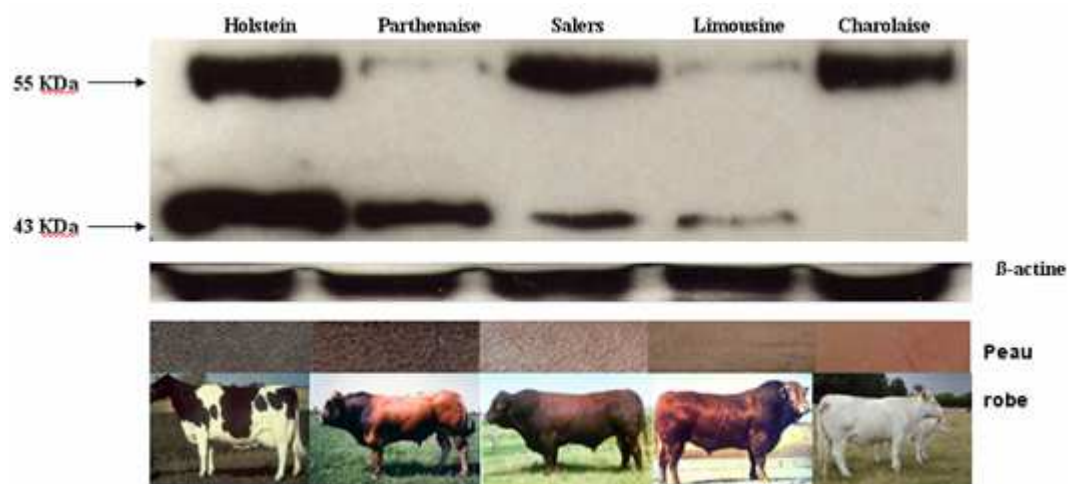


Figure 61 : Profil du western blot réalisé avec 50 µg de protéine totale. L'actine sert de contrôle quantitatif des protéines utilisées.

Une analyse globale du western blot montre que le profil est similaire à celui obtenue chez la Holstein (tache noire) à l'exception de la race charolaise qui ne présente qu'une bande à 55 kDa. Par ailleurs l'intensité de cette dernière est variable selon l'origine raciale de l'échantillon. Elle est très représentée dans le cas de la Holstein, la Salers et la Charolaise et, faiblement représentée dans le cas de la Limousine et la Parthenaise.

La bande à 43 kDa est fortement représentée chez la Holstein et, son intensité diminue significativement pour les autres races pour devenir indétectable pour la race charolaise. Ce résultat suggère fortement une corrélation entre la pigmentation de la peau bovine et la quantité du récepteur PAR-2. En effet, la peau noire du Holstein (tache noire) présente le maximum détectable de PAR-2 alors qu'une peau blanche (Charolaise) PAR-2 reste indétectable. Entre ces deux extrêmes, l'intensité de la bande diminue en fonction de la pigmentation de la peau. Il est à noter que cette corrélation entre la quantité de PAR-2 et la pigmentation cutanée de l'animal reste spécifique à la peau bovine. En effet, elle ne semble pas être valable dans le cas des autres tissus (**figures 59 et 60**).

Alors que chez l'homme une corrélation entre l'expression du gène *PAR-2* et la pigmentation cutanée a été établie, chez le bovin, une corrélation similaire existe également. Cependant chez le bovin, la pigmentation de la peau semble être régulée à un niveau post-transcriptionnelle. En effet, le niveau de l'ARNm *PAR-2* est identique pour toutes les races étudiées.

Le résultat le plus marquant de cette analyse est que la détection de PAR-2 dans les organes, en l'occurrence le foie et le rein est indépendante de la couleur de la peau de l'animal, alors que son expression cutanée dépend de la coloration cutanée (**figures 59, 60 et**

61). Par ailleurs l'activité effective de PAR-2 au niveau de la peau semble être modulée en fonction de la quantité de l'eumélanine (pigment noir).

PAR-2 fait parti de la nouvelle famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont activés par un mécanisme unique mettant en jeu l'action d'une sérine protéase et par la suite l'action d'un agoniste qui fait parti intégrant du récepteur.

Les mécanismes qui régissent la régulation des PARs et en particulier PAR-2 sont divers et très complexes (voir introduction). Il est très difficile aujourd'hui de proposer une hypothèse raisonnée qui expliquerait la variation de PAR-2 en fonction de la couleur de la peau.

VI. CONCLUSION

Le cheptel bovin français compte plus de 20 millions de têtes réparties en une quarantaine de races qui ont généralement une origine régionale bien identifiée et une couleur de robe souvent caractéristique, héritée du travail des premiers éleveurs sélectionneurs aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles. Le phénotype de la robe des bovins, spécifié dans le Herd-book de chaque race, constitue un des critères majeurs de la certification de l'appartenance d'un individu à une race donnée. La couleur de la robe est sous-tendue par des différences moléculaires au niveau des gènes impliqués dans l'établissement de ce phénotype. La mise en évidence de ces caractéristiques génétiques propres à chaque race permettrait la mise au point de tests moléculaires visant à déterminer l'origine raciale de n'importe quel échantillon bovin.

Le patron de coloration de la robe, des muqueuses et des phanères a joué un rôle déterminant dans l'histoire des races bovines : alors qu'une race bovine présente une variabilité des performances et du génome, elle est précisément décrite et fixée pour sa couleur, qui devient donc un élément caractéristique de l'appartenance raciale d'un animal, et des produits qui en dérivent.

La découverte de l'allèle *SILVER* spécifique de la race charolaise et l'allèle A^{br} du gène *AGOUTI* de la race Normande démontre qu'il est possible d'exploiter le polymorphisme génétique des gènes de coloration pour proposer des marqueurs appropriés pour une traçabilité raciale des animaux.

Le travail de ce mémoire s'inscrivait dans ce cadre avec l'étude du gène *PAR-2*. Une corrélation directe entre le niveau d'expression de ce dernier et la pigmentation humaine a été démontrée (Babiarz-Magee et al., 2004) suggérant que toute modification de l'activité de ce gène aurait un effet sur la pigmentation. Néanmoins, il n'existe pas de mutant identifié chez la souris, et le génotypage de l'allèle découvert chez l'homme n'a pas été réalisé au sein des différentes populations et ethnies (Compton et al., 2000).

Les allèles *PAR-2* que nous avons identifiés chez le bovin présentent une grande variation au sein des 293 animaux appartenant à 14 races bovines européennes. Cependant aucun des trois allèles n'est associé à une pigmentation donnée et leurs utilisations en terme de traçabilité raciale restent une approche probabiliste.

Nous avons également analysé l'expression de ce gène au sein de diverses races avec des pigmentations de peaux et/ou de poils différentes. Nous avons montré que *PAR-2* bovin

contrairement à son orthologue humain présentait plutôt une régulation post-transcriptionnelle spécifiquement cutanée en fonction de la pigmentation de la peau.

L'exploitation de ces différences en terme d'identification d'outils moléculaires de traçabilité raciale est à présent difficile à prévoir en raison de la diversité et la complexité des mécanismes qui régissent l'activité effective de ce type de récepteur.

L'approche protéomique comparative constitue une des perspectives majeures de ce travail afin de caractériser les facteurs impliqués.

VII. RÉFÉRENCES

- Abdel-Malek, Z. A., J. Knittel, A. L. Kadokaro, V. B. Swope, and R. Starner. 2008. The melanocortin 1 receptor and the uv response of human melanocytes--a shift in paradigm. *Photochem Photobiol* 84: 501-508.
- 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.
- Al-Ani, B., K. K. Hansen, and M. D. Hollenberg. 2004. Proteinase-activated receptor-2: Key role of amino-terminal dipeptide residues of the tethered ligand for receptor activation. *Mol Pharmacol* 65: 149-156.
- Al-Ani, B. et al. 1999. Proteinase-activated receptor 2 (par(2)): Development of a ligand-binding assay correlating with activation of par(2) by par(1)- and par(2)-derived peptide ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 753-760.
- Anderson, D. E. 1991. Genetic study of eye cancer in cattle. *J Hered* 82: 21-26.
- Babiarz-Magee, L., N. Chen, M. Seiberg, and C. B. Lin. 2004. The expression and activation of protease-activated receptor-2 correlate with skin color. *Pigment Cell Res* 17: 241-251.
- Barrington A, Pearson K (1906) On the inheritance of coat color in cattle. *Biometrika* 4, 427-464. doi: 10.2307/2331638
- Barsh, G. 1999. From agouti to pomc--100 years of fat blonde mice. *Nat Med* 5: 984-985.
- 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. Anjaiah, 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.
- Bhawan, J. 1979. Ultrastructure of melanocyte-keratinocyte interactions in pigmented basal cell carcinoma. *Pigment Cell Res* 5: 38-47.
- Bohm, S. K., E. F. Grady, and N. W. Bunnett. 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by g-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322 (Pt 1): 1-18.

- Bohm, S. K. et al. 1996b. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 271: 22003-22016.
- Bohm, S. K. et al. 1996a. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 314 (Pt 3): 1009-1016.
- Bologna, J. L., J. L. Jorizzo, and R. Rapini. 2003. *Dermatology*. Elsevier.
- Botchkarev, V. A. 2003. Stress and the hair follicle: Exploring the connections. *Am J Pathol* 162: 709-712.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brass, L. F. et al. 1994. Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. *J Biol Chem* 269: 2943-2952.
- Burgoyne, R. D., and A. Morgan. 2003. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83: 581-632.
- Cerdan, D., G. Redziniak, C. A. Bourgeois, M. Monsigny, and C. Kieda. 1992. C32 human melanoma cell endogenous lectins: Characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes. *Exp Cell Res* 203: 164-173.
- Charlier, C. et al. 1996. Microsatellite mapping of the bovine roan locus: A major determinant of white heifer disease. *Mamm Genome* 7: 138-142.
- Chase, H. B., and H. Rauch. 1950. Greying of hair. Ii. Response of individual hairs in mice to variations in x-radiation. *J. Morphol* 87: 381-392.
- Chhajlani, V., and J. E. Wikberg. 1992. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309: 417-420.
- Compton, S. J. 2003. Glycosylation and proteinase activated receptor function. *Drug development research* 59.
- Compton, S. J. et al. 2000. A polymorphic protease-activated receptor 2 (par2) displaying reduced sensitivity to trypsin and differential responses to par agonists. *J Biol Chem* 275: 39207-39212.
- Compton, S. J., S. Sandhu, S. J. Wijesuriya, and M. D. Hollenberg. 2002. Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hpar2): Role in cell surface expression and signalling. *Biochem J* 368: 495-505.

- Costin, G. E., J. C. Valencia, W. D. Vieira, M. L. Lamoreux, and V. J. Hearing. 2003. Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (oca) type 4. *J Cell Sci* 116: 3203-3212.
- Derian, C. K., A. J. Eckardt, and P. Andrade-Gordon. 1997. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ* 8: 743-749.
- Dery, O., C. U. Corvera, M. Steinhoff, and N. W. Bunnett. 1998. Proteinase-activated receptors: Novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274: C1429-1452.
- Du, J. et al. 2003. *Mlana/mart1* and *silv/pmell17/gp100* are transcriptionally regulated by *mitf* in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 163: 333-343.
- Ebling, F. J. 1987. Biology of hair follicles. *Dermatology in general medicine*. T. B. Fitzpatrick, A. Z. Eisen, K. Wolff, I. M. Freedberg and K. F. Austen. New York, McGraw-Hill 1: 213-219.
- Eller, M. S., and B. A. Gilchrist. 2000. Tanning as part of the eukaryotic sos response. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8: 94-97.
- Enshell-Seijffers, D., C. Lindon, and B. A. Morgan. 2008. The serine protease corin is a novel modifier of the agouti pathway. *Development* 135: 217-225.
- 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 *plotch* (*sp*) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 532-536.
- Fitch, K. R. et al. 2003. Genetics of dark skin in mice. *Genes Dev* 17: 214-228.
- Fitzpatrick, T. B., and A. S. Breathnach. 1963. [the epidermal melanin unit system.]. *Dermatol Wochenschr* 147: 481-489.
- Frenk, E., and J. P. Schellhorn. 1969. [morphology of the epidermal melanin unit]. *Dermatologica* 139: 271-277.
- Friedl, P., and J. Storim. 2004. Diversity in immune-cell interactions: States and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol* 14: 557-567.
- Fuchs, E., B. J. Merrill, C. Jamora, and R. DasGupta. 2001. At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell* 1: 13-25.
- Fukuda, M. 2005. Versatile role of *rab27* in membrane trafficking: Focus on the *rab27* effector families. *J Biochem* 137: 9-16.

- Gantz, I. et al. 1993a. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268: 15174-15179.
- Gantz, I. 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.
- Garcia-Borron, J. C., B. L. Sanchez-Laorden, and C. Jimenez-Cervantes. 2005. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 18: 393-410.
- Garcia, R. I., E. Flynn, and G. Szabo. 1979. Ultrastructure of melanocyte-keratinocyte interactions. *Pigment Cell Res* 4: 299-307.
- Geras, A. J. 1990. *Dermatology. A Medical Artist's Interpretation*. Switzerland, Sandoz Medical Publications.
- Girardot, M. et al. 2006. The insertion of a full-length *bos taurus* line element is responsible for a transcriptional deregulation of the *normande agouti* gene. *Pigment Cell Res* 19: 346-355.
- Giuffra, E. 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.
- Grimsley, C., and K. S. Ravichandran. 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: Eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 13: 648-656.
- 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.
- Haitina, T. et al. 2007. Functional characterization of two melanocortin (*mc*) receptors in lamprey showing orthology to the *mc1* and *mc4* receptor subtypes. *BMC Evol Biol* 7: 101.
- Hardy, M. H. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* 8: 55-61.
- Hein, L., K. Ishii, S. R. Coughlin, and B. K. Kobilka. 1994. Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a *g* protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 269: 27719-27726.
- Hoashi, T. et al. 2005. *Mart-1* is required for the function of the melanosomal matrix protein *pmel17/gp100* and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 280: 14006-14016.

- Hollenberg, M. D., M. Saifeddine, and B. al-Ani. 1996. Proteinase-activated receptor-2 in rat aorta: Structural requirements for agonist activity of receptor-activating peptides. *Mol Pharmacol* 49: 229-233.
- Hoxie, J. A. et al. 1993. Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J Biol Chem* 268: 13756-13763.
- Huber, W. E. 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.
- Hume, A. N. et al. 2002. The leaden gene product is required with rab27a to recruit myosin va to melanosomes in melanocytes. *Traffic* 3: 193-202.
- Hung, D. T., Y. H. Wong, T. K. Vu, and S. R. Coughlin. 1992. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 267: 20831-20834.
- Hustad, C. M. et al. 1995. Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics* 140: 255-265.
- Ibsen, H. L. 1933. Cattle inheritance. I. Color. *Genetics* 18:441-480. Pitt, F., 1920 Notes on the inheritance of colour and markings in pedigree Hereford cattle. *J. Genet.* 9:281-302.
- Imokawa, G. 2004. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 17: 96-110.
- Ishii, K. et al. 1994. Inhibition of thrombin receptor signaling by a g-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among g-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 269: 1125-1130.
- Jackson, I. J. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet* 28: 189-217.
- Joerg, H., H. R. Fries, E. Meijerink, and G. F. Stranzinger. 1996. Red coat colour in holstein cattle is associated with a deletion in the mshr gene. *Mammalian Genome* 7: 317-318.
- 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.
- Kadekaro, A. L. et al. 2003. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. The sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res* 16: 434-447.

- Kelleher, J. F., and M. A. Titus. 1998. Intracellular motility: How can we all work together? *Curr Biol* 8: R394-397.
- 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.
- Kong, W. et al. 1997. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8884-8889.
- Kulesa, H., G. Turk, and B. L. Hogan. 2000. Inhibition of bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *Embo J* 19: 6664-6674.
- 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. Gilchrist. 1992. Cytoskeletal events underlying dendrite formation by cultured pigment cells. *J Cell Physiol* 151: 287-299.
- Lamason, R. L. et al. 2005. Slc24a5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310: 1782-1786.
- Lauvergne, J. J. 1966. Génétique de la couleur du pelage des bovins domestiques. *Bibliographica Genetica* 20: 1-168.
- Lerner, D. J., M. Chen, T. Tram, and S. R. Coughlin. 1996. Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J Biol Chem* 271: 13943-13947.
- Lu, D. et al. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
- Luelmo-Aguilar, J., and M. S. Santandreu. 2004. Folliculitis: Recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 5: 301-310.
- Majerus, M. E., and N. I. Mundy. 2003. Mammalian melanism: Natural selection in black and white. *Trends Genet* 19: 585-588.
- Mak, S. S., M. Moriyama, E. Nishioka, M. Osawa, and S. Nishikawa. 2006. Indispensable role of bcl2 in the development of the melanocyte stem cell. *Dev Biol* 291: 144-153.
- Marieb, E. N. 1993. Anatomie et physiologie humaines. Québec, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc.

- Marthinuss, J., P. Andrade-Gordon, and M. Seiberg. 1995. A secreted serine protease can induce apoptosis in pam212 keratinocytes. *Cell Growth Differ* 6: 807-816.
- Matsunaga, N. 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. 1967. Temporal skin factors influencing the development of melanoblasts in piebald mice. *J Exp Zool* 166: 397-403.
- Mayer, T. C. 1973. The migratory pathways of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev. Biol.* 34: 39-46.
- Mayer, T. C., and L. Oddis. 1977. Pigment cell differentiation in embryonic mouse skin and isolated epidermis: An in vitro study. *J Exp Zool* 202: 415-424.
- McGill, G. G. et al. 2002. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109: 707-718.
- Menasche, G. et al. 2000. Mutations in rab27a cause griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 25: 173-176.
- Millar, S. E. 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol* 118: 216-225.
- 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. et al. 1997. Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* 146: 1407-1415.
- Mintz, B. 1967. Gene control of mammalian pigmentary differentiation. 1. Chorial origin of melanocytes. *Proc nat Acad Sci, USA* 58: 344-351.
- Minwalla, L., Y. Zhao, I. C. Le Poole, R. R. Wickett, and R. E. Boissy. 2001. Keratinocytes play a role in regulating distribution patterns of recipient melanosomes in vitro. *The Journal of Investigative Dermatology* 117.
- Mishima, Y., and S. Widlan. 1966. Embryonic development of melanocytes in human hair and epidermis. Their cellular differentiation and melanogenic activity. *J Invest Dermatol* 46: 263-277.
- Miyamura, Y. et al. 2007. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 20: 2-13.

- Molino, M. et al. 1997. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and par-2. *J Biol Chem* 272: 4043-4049.
- Molino, M. et al. 1995. Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin g. *J Biol Chem* 270: 11168-11175.
- Moll, I. 1994. Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell Tissue Res* 277: 131-138.
- Moll, I. 1996. Differential epithelial outgrowth of plucked and microdissected human hair follicles in explant culture. *Arch Dermatol Res* 288: 604-610.
- Morgan, T. H. 1911. The origin of five mutations in eye color in drosophila and their modes of inheritance. *Science* 33: 534-537.
- 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.
- Nagle, D. L. et al. 1999. The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* 398: 148-152.
- Nanevicz, T. et al. 1995. Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J Biol Chem* 270: 21619-21625.
- Nanevicz, T., L. Wang, M. Chen, M. Ishii, and S. R. Coughlin. 1996. Thrombin receptor activating mutations. Alteration of an extracellular agonist recognition domain causes constitutive signaling. *J Biol Chem* 271: 702-706.
- Newton, J. M. et al. 2001. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, oca4. *Am J Hum Genet* 69: 981-988.
- Nishimura, E. K., S. R. Granter, and D. E. Fisher. 2005. Mechanisms of hair graying: Incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307: 720-724.
- Nishimura, E. K. et al. 2002. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416: 854-860.
- Nystedt, S., K. Emilsson, A. K. Larsson, B. Strombeck, and J. Sundelin. 1995a. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232: 84-89.
- Nystedt, S., K. Emilsson, C. Wahlestedt, and J. Sundelin. 1994. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9208-9212.

- Nystedt, S., E. K., L. A.K., S. B., and S. J. 1995b. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinaseactivated receptor 2. *Eur J Biochem* 232: 84–89.
- Okazaki, K., M. Uzuka, F. Morikawa, K. Toda, and M. Seiji. 1976. Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J Invest Dermatol* 67: 541-547.
- Olson, T. A. 1999. Genetics of colour variation. CAB international: 33-53.
- Olson, T. A., and R. L. Willham. 1982. Inheritance of coat coloration and spotting patterns of cattle: A review. *Research Bulletin* 595 Ames, Iowa
- Orlow, S. J. 1995. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 105: 3-7.
- Oulmouden, A., R. Julien, M. P. Laforet, and H. Leveziel. 2005. Use of silver gene for authentication of the racial origin of animal populations, and of the derivative products thereof. WO2005/019473.
- Paine, C. et al. 2001. An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the par-2 pathway. *J Invest Dermatol* 116: 587-595.
- Pang, R. T. et al. 1999. Role of n-linked glycosylation on the function and expression of the human secretin receptor. *Endocrinology* 140: 5102-5111.
- Pastural, E. et al. 1997. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-va gene. *Nat Genet* 16: 289-292.
- 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.
- Quittet, E. 1963. Races bovines françaises. La Maison Rustique, Paris.
- Rawles, M. E. 1947. Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryos. *Physiol. Zool* 20: 248-266.
- Renesto, P. et al. 1997. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin g, and proteinase 3: Evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 89: 1944-1953.

- Renieri, C., P. Ceccarelli, A. M. Gargiulo, J. J. Lauvergne, and G. Monacelli. 1993. Chemical and electron microscopic studies of cattle (*bos taurus*) with four types of phenotypic pigmentation. *Pigment Cell Res* 6: 165-170.
- Rieder, S., S. Taourit, D. Mariat, B. Langlois, and G. Guerin. 2001. Mutations in the agouti (*asip*), the extension (*mc1r*), and the brown (*tyrp1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*equus caballus*). *Mamm Genome* 12: 450-455.
- Robbins, L. S. 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.
- Rosdahl, I. 1979. The epidermal melanocyte population and its reaction to ultraviolet light. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) Suppl* 88: 1-43.
- Roselli-Rehffuss, L. 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.
- Rouzaud, F. et al. 2000. A first genotyping assay of french cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (*mc1r*). *Genet Sel Evol* 32: 511-520.
- RusT, C. C. 1962. Temperature as a modifying factor in the spring pelage change of shorttailed weasels. *J Mammal* 43: 323-328.
- Saifeddine, M., B. al-Ani, C. H. Cheng, L. Wang, and M. D. Hollenberg. 1996. Rat proteinase-activated receptor-2 (*par-2*): Cdna sequence and activity of receptor-derived peptides in gastric and vascular tissue. *Br J Pharmacol* 118: 521-530.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Sato, S. et al. 2005. Ion transport regulated by protease-activated receptor 2 in human airway calu-3 epithelia. *Br J Pharmacol* 146: 397-407.
- Scarborough, R. M. et al. 1992. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem* 267: 13146-13149.
- Schmidt, V. A., W. C. Nierman, T. V. Feldblyum, D. R. Maglott, and W. F. Bahou. 1997. The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tightly linked on chromosome 5q13. *Br J Haematol* 97: 523-529.

- Schmidt, V. A., E. Vitale, and W. F. Bahou. 1996. Genomic cloning and characterization of the human thrombin receptor gene. Structural similarity to the proteinase activated receptor-2 gene. *J Biol Chem* 271: 9307-9312.
- Schmutz, S. M. et al. 2004. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm Genome* 15: 62-67.
- Schouwey, K. et al. 2007. Notch1 and notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. *Dev Dyn* 236: 282-289.
- Scott, G. et al. 2001. Protease-activated receptor 2, a receptor involved in melanosome transfer, is upregulated in human skin by ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 117: 1412-1420.
- Scott, G. et al. 2003. The proteinase-activated receptor-2 mediates phagocytosis in a rho-dependent manner in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 121: 529-541.
- Scott, G. et al. 2004. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: Analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of pge2 and pgf2alpha on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol* 122: 1214-1224.
- Searle, A. G. 1968. Comparative genetics of coat colour in mammals. Logos Press, London.
- Seiberg, M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res* 14: 236-242.
- Seiberg, M. et al. 2000a. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol* 115: 162-167.
- Seiberg, M. et al. 2000b. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 254: 25-32.
- Seiji, M., and S. Iwashita. 1963. On the site of melanin formation in melanocytes. *J Biochem* 54: 465-467.
- 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.
- Sharlow, E. R. et al. 2000. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci* 113 (Pt 17): 3093-3101.
- Steingrimsson, E., N. G. Copeland, and N. A. Jenkins. 2006. Mouse coat color mutations: From fancy mice to functional genomics. *Dev Dyn* 235: 2401-2411.
- Stenn, K. S., and R. Paus. 2001. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81: 449-494.

- Stuart, L. M., and R. A. Ezekowitz. 2005. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* 22: 539-550.
- Stuart, L. M., K. Takahashi, L. Shi, J. Savill, and R. A. Ezekowitz. 2005. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol* 174: 3220-3226.
- Sugiyama, S., and A. Kukita. 1976. Melanocyte reservoir in the hair follicles during the hair growth cycle: An electron microscopic study. In: Toda K, Ishibashi Y, Hori Y, Morikawa F, eds. *Biology and disease of the hair*. University of Tokyo Press: 181-200.
- Sundberg, J. P., and L. E. King, Jr. 1996. Mouse models for the study of human hair loss. *Dermatol Clin* 14: 619-632.
- Suzuki, I., R. D. Cone, S. Im, J. Nordlund, and Z. A. Abdel-Malek. 1996. Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor mclr on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 137: 1627-1633.
- Swift, J. A. 1964. Transfer of melanin granules from melanocytes to the cortical cells of human hair. *Nature* 203: 976-977.
- Tadokoro, T. et al. 2003. Uv-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *Faseb J* 17: 1177-1179.
- Taylor, A. C. 1949. Survival of rat skin and changes in hair pigmentation following freezing. *J Exp Zool* 110: 77-111.
- Tomita, Y., and T. Suzuki. 2004. Genetics of pigmentary disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 131C: 75-81.
- Valverde, P., E. Healy, I. Jackson, J. L. Rees, and A. J. Thody. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11: 328-330.
- Van Den Bossche, K., J. M. Naeyaert, and J. Lambert. 2006. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7: 769-778.
- Van Raamsdonk, C. D., K. R. Fitch, H. Fuchs, M. H. de Angelis, and G. S. Barsh. 2004. Effects of g-protein mutations on skin color. *Nat Genet* 36: 961-968.
- Virador, V. M. et al. 2002. Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *Faseb J* 16: 105-107.

- Voisey, J., and A. van Daal. 2002. Agouti: From mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 15: 10-18.
- Vouret-Craviari, V., P. Auburger, J. Pouyssegur, and E. Van Obberghen-Schilling. 1995a. Distinct mechanisms regulate 5-ht₂ and thrombin receptor desensitization. *J Biol Chem* 270: 4813-4821.
- Vouret-Craviari, V. et al. 1995b. Post-translational and activation-dependent modifications of the g protein-coupled thrombin receptor. *J Biol Chem* 270: 8367-8372.
- Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton, and S. R. Coughlin. 1991a. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068.
- Vu, T. K., V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo, and S. R. Coughlin. 1991b. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353: 674-677.
- Weedon, D., and G. Strutton. 1981. Apoptosis as the mechanism of the involution of hair follicles in catagen transformation. *Acta Derm Venereol* 61: 335-339.
- Wei, M. L. 2006. Hermansky-pudlak syndrome: A disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res* 19: 19-42.
- Wilson, S. M. et al. 2000. A mutation in rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7933-7938.
- 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.
- Yamaguchi, Y., M. Brenner, and V. J. Hearing. 2007a. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 282: 27557-27561.
- Yamaguchi, Y., V. J. Hearing, S. Itami, K. Yoshikawa, and I. Katayama. 2005. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: Aiming for site-specific tissue regeneration. *J Dermatol Sci* 40: 1-9.
- Yamaguchi, Y. et al. 2004. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: Increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol* 165: 275-285.
- Yamaguchi, Y. et al. 2007b. The effects of dickkopf 1 on gene expression and wnt signaling by melanocytes: Mechanisms underlying its suppression of melanocyte function and proliferation. *J Invest Dermatol* 127: 1217-1225.
- 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.

- Yasumoto, K. 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.
- Zacharias, U. et al. 1995. Thrombin, phorbol ester, and camp regulate thrombin receptor protein and mRNA expression by different pathways. *J Biol Chem* 270: 545-550.

Pigmentation de la peau chez le bovin : Etude du polymorphisme et de l'expression du gène *PAR-2*.

Le travail présenté dans ce mémoire a été entrepris dans le cadre d'un programme de recherche de marqueurs génétiques des races bovines. Il consiste en l'étude du gène *PAR-2* (Proteinase-Activated receptor 2) impliqué dans la pigmentation cutanée.

L'analyse du polymorphisme de ce gène chez le bovin a révélé l'existence de deux allèles, *par2.1* et *par2.2* en plus l'allèle sauvage *PAR-2*. Les deux variants *par2.1* et *par2.2* se caractérisent par des substitutions qui affectent le peptide activateur du récepteur *PAR-2*. Néanmoins, nous n'avons pas identifié d'association entre l'un des trois allèles et l'une des différentes colorations de la peau bovine. Par ailleurs, le niveau de transcription de *PAR-2* est identique au niveau de toute la peau de toutes les races bovines étudiées. En revanche, nous avons mis en évidence une régulation post-transcriptionnelle en fonction de la coloration de la peau.

Mots-clés : *PAR-2*, pigmentation cutanée, bovin, génotypage.

Pigmentation of skin in the cattle: studies of polymorphism and expression of *PAR-2* gene.

The work presented in this thesis was undertaken as part of a research program of genetic markers of cattle breeds. It consists of the study of *PAR-2* (Proteinase activated receptor-2) gene involved in skin pigmentation.

The polymorphism studies of this gene in cattle revealed the existence of two alleles, *par2.1* and *par2.2* in addition to the wild-type allele *PAR-2*. Both variants *par2.1* and *par2.2* are characterized by amino acid substitutions affecting the activating peptide of the *PAR-2* receptor.

However, not a single allele among the three alleles identified had any association with any of the different bovine skin colours. Furthermore, the level of transcript of *PAR-2* is identical in the skins of all cattle breeds studied. However, we have identified a post-transcriptional regulation depending on the colour of the skin. The molecular mechanism of such a regulation which determines the amount of *PAR-2* receptor on the basis of skin colour among cattle remains to be determined.

Key words: *PAR-2*, skin pigmentation, bovine, genotyping