

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la vie et de la santé

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n° [58-2008]

## Thèse

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

**Discipline : Biologie, Sciences et Santé**

Présentée et soutenue publiquement par

**Amro KABBARA**

le 29 octobre 2008

**Coloration de la robe chez le bovin.  
Etudes fonctionnelles des allèles du gène *Silver/Pmel17* bovin et,  
contribution à l'identification de gènes impliqués dans le changement  
post-natal de la coloration chez la race Gasconne.**

Directeur de thèse : Ahmad Oulmouden

**JURY :**

**Rapporteurs**

M<sup>f</sup> Daniel VAIMAN, Directeur de recherche CNRS

M<sup>f</sup> Jean-Luc VILOTTE, Directeur de recherche INRA

**Examineurs**

M<sup>me</sup> Geneviève Aubin-Houzelstein, CR1, INRA

M<sup>f</sup> Ahmed Amine Khamlichi, CR1, CNRS

M<sup>f</sup> Ahmad Oulmouden, Professeur, Université de Limoges

M<sup>f</sup> Abderrahman Maftah, Professeur, Université de Limoges



## Remerciements

*Je souhaite remercier, tout d'abord, les membres du jury pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : Monsieur Daniel Vaiman et Monsieur Jean-Luc Vilotte pour avoir accepté de juger mon travail, Madame Geneviève Aubin-Houzelstein, Monsieur Ahmed Amine Khamlichi, Monsieur Abderrahman Maftah et Monsieur Ahmad Oulmouden.*

*Je tiens à remercier le Département de Génétique Animale de l'INRA, le Conseil Régional du Limousin et l'Université de Limoges pour leur soutien financier.*

*Je remercie l'UMR1061 d'avoir mis à ma disposition les moyens financiers et le matériel pour mener à bien ce travail.*

*J'exprime également ma gratitude à Monsieur Raymond Julien de m'avoir accueilli au sein de l'Institut des Sciences de la vie et de la santé. Je souhaite également le remercier pour ses précieux conseils et ses idées ingénieuses.*

*Je remercie Monsieur Hubert Levéziel pour m'avoir suivi dans mes démarches.*

*Je remercie Ahmad Oulmouden, pour son temps, son énergie, sa confiance et son encadrement accordés tout au long de ma thèse. Je n'oublie pas non plus son côté humain, compréhensif et ouvert.*

*Je remercie également Véronique Blanquet pour son soutien à la conception du projet de souris transgénique et son suivi. Je retiens aussi ses remarques constructives. Je remercie également Laëtitia Magnol pour son précieux soutien en culture des cellules ES.*

*Je remercie « Le King de la PCRq » Lionel Forestier pour son aide, le travail d'équipe sur l'étude semi-quantitative, ses conseils techniques et pour avoir pris le temps de lire avec soin la partie quantitative.*

*Je n'oublie pas la nouvelle équipe du deuxième étage : Sébastien Arico, Daniel Petit et Gaylord Auvray. Je vous remercie d'avoir accepté de partager quelques questions et réflexions scientifiques indispensables à mon travail.*

*Je remercie Anne Blondeau Da Silva pour avoir pris le temps de lire mon manuscrit de thèse. Je remercie également Dominique Rocha pour sa lecture de la partie in vitro.*

*Je remercie Fabrice Dupuy, pour avoir lu une partie des résultats de ma thèse et pour ses remarques.*

*Je remercie Docteur Chantal Jayat-Vignoles pour ses conseils précieux en microscopie, et sa gentillesse. Je remercie également Madame Claire Carrion pour ses conseils en microscopie confocale.*

*Je remercie Docteur Faraj Terro pour sa collaboration sur l'étude immunocytochimique. Je remercie Danielle Troutaud pour sa gentillesse et pour m'avoir mis en contact avec Monsieur Terro.*

*Je remercie Marie-Pierre Laforêt pour sa patience sur les commandes, mais surtout sa gentillesse.*

*La liste n'est jamais complète ; je remercie toute la jeunesse du labo (20-100 ans), pour avoir supporté mon caractère : Abdul, Antoine Aurélien, Aymeric, Benoît, Christelle, Emilie, Karine, Lamia, Marie-Clémence, Mathilde, Nathalie pour sa lecture des résultats, Olivier, Renaud et Xavier .... La liste est non exhaustive. Pour les doctorants courage, et surtout bonne chance !!*

*Je remercie tous les amis qui ont pris le temps de partager mes joies et mes peines : Sébastien Kilburger pour son humour, sa franchise et sa confiance, Louis Del Rio pour son fou rire et malgré ses crises parfois (pour rire !!), Serge Olivier (réponse : je sais !) pour son soutien moral, Nicolas Delhote pour son ouverture d'esprit, Sami El-Sabbagh pour sa gentillesse et les bons moments, et Mohammad Jeaid.*

*Je remercie mon oncle Medreck pour m'avoir soutenu et pour ses conseils précieux dans la vie.*

*Je remercie ma famille pour leur amour inconditionnel.*

*Je remercie Carine pour son amour, son attention et sa compréhension.*

## Sommaire

<b>I. Exposé bibliographique</b>	<b>13</b>
<b>I.1 La pigmentation chez les mammifères</b>	<b>13</b>
<b>I.1.1 Les mélanocytes et les mélanosomes</b>	<b>13</b>
<b>I.1.2 Régulation de la mélanogenèse</b>	<b>15</b>
<b>I.1.3 Le transport des mélanosomes</b>	<b>17</b>
<b>I.1.4 Le transfert des mélanosomes</b>	<b>19</b>
<b>I.2 Mitf : un déterminant des mélanocytes</b>	<b>21</b>
<b>I.3 La pigmentation chez le bovin</b>	<b>25</b>
<b>I.3.1 Le locus Extension (E)</b>	<b>25</b>
<b>I.3.2 Le locus Agouti (A)</b>	<b>26</b>
<b>I.3.3 Le locus Albinos (C)</b>	<b>28</b>
<b>I.3.4 Le locus Dun</b>	<b>28</b>
<b>I.3.5 Le locus Dilute</b>	<b>29</b>
<b>I.3.6 Les mutations White-spotting</b>	<b>29</b>
<b>I.3.6.1 Les mutants du locus S</b>	<b>29</b>
<b>I.3.6.2 Les mutants Blaze (Blason)</b>	<b>30</b>
<b>I.3.6.3 Les mutants Roan</b>	<b>30</b>
<b>I.3.6.4 Les mutants Colour-sided (flanc coloré)</b>	<b>31</b>
<b>I.3.6.5 Les mutants Belted</b>	<b>32</b>
<b>I.3.6.6 Les mutants Brockling</b>	<b>32</b>
<b>I.4 Silver</b>	<b>35</b>
<b>I.4.1 Le gène SILVER/PMEL17</b>	<b>35</b>
<b>I.4.2 Le transcrit</b>	<b>35</b>
<b>I.4.3 La protéine Silver / Pmel17</b>	<b>36</b>
<b>I.4.4 Synthèse, trafic et adressage</b>	<b>37</b>
<b>I.4.5 Les partenaires mélanosomiques de Silver/Pmel17</b>	<b>38</b>
<b>I.4.5.1 Mart1/Mlana</b>	<b>38</b>
<b>I.4.6 Les mutations</b>	<b>39</b>
<b>I.4.6.1 La souris (Mus Musculus)</b>	<b>39</b>
<b>I.4.6.2 L'homme (Homo sapiens)</b>	<b>41</b>
<b>I.4.6.3 Le poulet (Gallus gallus)</b>	<b>42</b>
<b>I.4.6.4 Le chien (Canis lupus familiaris)</b>	<b>43</b>
<b>I.4.6.5 Le cheval (Equus caballus)</b>	<b>44</b>

<b>I.4.6.6</b>	<b>Le poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)</b>	<b>44</b>
<b>I.4.6.7</b>	<b>Le bovin (<i>Bos taurus</i>)</b>	<b>45</b>
<b>II.</b>	<b>Projet de thèse</b>	<b>49</b>
<b>II.1</b>	<b>Introduction du projet</b>	<b>49</b>
<b>II.2</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>51</b>
<b>II.2.1</b>	<b>Matériels et méthodes du projet souris transgénique</b>	<b>51</b>
<b>II.2.1.1</b>	<b>Techniques de Biologie moléculaire</b>	<b>51</b>
<b>II.2.1.1.A</b>	<b>Préparation d'ADN génomique</b>	<b>51</b>
<b>II.2.1.1.B</b>	<b>Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</b>	<b>51</b>
<b>II.2.1.1.C</b>	<b>Purification des acides nucléiques</b>	<b>52</b>
<b>II.2.1.1.D</b>	<b>Clonage de fragments PCR</b>	<b>52</b>
<b>II.2.1.1.E</b>	<b>Séquençage</b>	<b>53</b>
<b>II.2.1.1.F</b>	<b>Digestions enzymatiques</b>	<b>55</b>
<b>II.2.1.1.G</b>	<b>Mutagenèse dirigée</b>	<b>55</b>
<b>II.2.1.1.H</b>	<b>Southern blot</b>	<b>56</b>
<b>II.2.1.2</b>	<b>Techniques de Biologie cellulaire</b>	<b>60</b>
<b>II.2.1.2.A</b>	<b>Préparation des fibroblastes primaires de souris</b>	<b>60</b>
<b>II.2.1.2.B</b>	<b>Culture des cellules souches embryonnaires Bruce4</b>	<b>62</b>
<b>II.2.1.2.C</b>	<b>Electroporation des cellules ES Bruce4 provenant de souris C57BL6J</b>	<b>62</b>
<b>II.2.2</b>	<b>Matériels et méthodes : Etude in vitro</b>	<b>64</b>
<b>II.2.2.1</b>	<b>Techniques de Biologie moléculaire</b>	<b>64</b>
<b>II.2.2.1.A</b>	<b>Constructions géniques</b>	<b>64</b>
<b>II.2.2.1.B</b>	<b>Western Blot</b>	<b>65</b>
<b>II.2.2.2</b>	<b>Techniques de Biologie cellulaire</b>	<b>68</b>
<b>II.2.2.2.A</b>	<b>Préparation des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney : Cellules embryonnaires de reins humains)</b>	<b>68</b>
<b>II.2.2.2.B</b>	<b>Transfection transitoire</b>	<b>69</b>
<b>II.2.3</b>	<b>Matériels et méthodes : Etude semi-quantitative</b>	<b>70</b>
<b>II.2.3.1</b>	<b>Préparation des échantillons</b>	<b>70</b>
<b>II.2.3.2</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>70</b>
<b>III.</b>	<b>Résultats</b>	<b>75</b>
<b>III.1</b>	<b>Etude fonctionnelle des allèles Dc et Ds du gène Silver / Pmel17 bovin par recombinaison homologue</b>	<b>75</b>
<b>III.1.1</b>	<b>Obtention du fragment de ciblage</b>	<b>77</b>
<b>III.1.2</b>	<b>Clonage de SILVHIND3-SPE1 dans le vecteur TopoXL</b>	<b>80</b>
<b>III.1.3</b>	<b>Mutagenèse dirigée</b>	<b>80</b>

<i>III.1.3.1</i>	<i>Préparation du vecteur pSK-PciI<sup>mut</sup></i>	<i>81</i>
<i>III.1.3.2</i>	<i>Clonage de SILVHIND3-SPE1 dans le pSK-PciI<sup>mut</sup></i>	<i>82</i>
<i>III.1.3.3</i>	<i>Préparation de pSi2.1 et pSi2.2 par mutagenèse dirigée</i>	<i>82</i>
<i>III.1.4</i>	<i>Clonage de la cassette Thymidine kinase</i>	<i>88</i>
<i>III.1.5</i>	<i>Clonage de la cassette Néomycine</i>	<i>89</i>
<i>III.1.6</i>	<i>Préparation du vecteur de ciblage pSi4.1</i>	<i>90</i>
<i>III.1.7</i>	<i>Préparation du vecteur de ciblage pSi4.0</i>	<i>90</i>
<i>III.1.8</i>	<i>Recherche de clones ES recombinants</i>	<i>92</i>
<i>III.1.9</i>	<i>Analyse en 3'</i>	<i>94</i>
<i>III.1.10</i>	<i>Aucun clone obtenu par un double évènement de crossing-over</i>	<i>94</i>
<i>III.2</i>	<i>Discussion et perspectives</i>	<i>95</i>
<i>III.3</i>	<i>Approche cellulaire in vitro</i>	<i>99</i>
<i>III.3.1.1</i>	<i>Expression de la protéine Silver bovine dans HEK293</i>	<i>99</i>
<i>III.3.1.2</i>	<i>Détection de la protéine Silver mutante</i>	<i>101</i>
<i>III.3.1.3</i>	<i>Effet de la mutation sur le clivage du peptide signal</i>	<i>103</i>
<i>III.3.1.4</i>	<i>Estimation du degré d'inhibition causé par la mutation Charolaise</i>	<i>104</i>
<i>III.3.2</i>	<i>Discussion et perspectives</i>	<i>106</i>
<i>III.4</i>	<i>Etude du changement de couleur de la robe chez le bovin : Cas particulier de la race Gasconne</i>	<i>110</i>
<i>III.4.1</i>	<i>Expression avant et après changement de couleur</i>	<i>110</i>
<i>III.4.1.1</i>	<i>Etude de l'expression du gène Agouti</i>	<i>113</i>
<i>III.4.1.2</i>	<i>Etude de l'expression des gènes Mc1r, Silver, Tyr, Trp1 et Trp2</i>	<i>113</i>
<i>III.4.2</i>	<i>Variations d'expression entre le pool de Gasconnes grises et des races à robe rouge</i>	<i>114</i>
<i>III.4.3</i>	<i>Variations d'expression entre le pool de Gasconnes grises et la race Holstein noire</i>	<i>119</i>
<i>III.4.4</i>	<i>Discussion et perspectives</i>	<i>119</i>
<i>III.5</i>	<i>Conclusion générale</i>	<i>125</i>



## Introduction

La couleur de la robe des mammifères est déterminée par les quantités relatives de deux pigments: l'eumélanine (brun/noir) et la phéomélanine (rouge/jaune). Ces pigments produits dans des cellules spécialisées, les mélanocytes, sont notamment présents dans la peau et les phanères. La variabilité de la couleur observée au sein de diverses espèces a toujours fasciné à la fois les éleveurs et les généticiens. Parce qu'il s'agit d'un critère de reconnaissance à l'évidence facilement utilisable, les éleveurs se sont depuis le début de la domestication, il y a plus de 6000 ans, intéressés à la couleur de la robe de leurs animaux de rente. Comme en témoignent les peintures murales et les papyrus égyptiens les plus anciens, c'est la diversité des patrons de coloration qui a eu pendant longtemps la faveur des premiers sélectionneurs de bovins. Considérée comme un témoignage de richesse et d'abondance, la robe était alors le fruit d'un métissage assez généralisé dû au mode d'élevage extensif et à la pratique du nomadisme. Une telle situation est encore rencontrée dans certains pays aux grands espaces. En Europe et particulièrement en France, on assista à l'introduction progressive de pratiques sélectives plus sévères. Cependant, il fallut attendre la fin du XIX<sup>ième</sup> siècle et la constitution des grands livres des races (Herd-Book) pour que les patrons de coloration de la robe soient expressément définis et s'imposent peu à peu. Les particularismes régionaux furent exploités dans des démarches identitaires et l'on vit se fondre dans un même creuset l'appartenance des éleveurs à un territoire, la nature des relations sociales et la couleur des vaches ! Aujourd'hui, les principales races françaises sont devenues quasiment des lignées animales possédant une couleur génétiquement fixée.

Au sein de l'UMR 1061, l'équipe de coloration dirigée par le Professeur Ahmad OULMOUDEN, s'intéresse à l'identification moléculaire des différents allèles de gènes de coloration chez le bovin. Ces allèles, qui deviendront alors des marqueurs génétiques, contribueront à une meilleure traçabilité raciale des populations bovines et de leurs produits dérivés ; traçabilité que les éleveurs souhaitent garantir aux consommateurs.

Parmi ces marqueurs génétiques que notre équipe a identifié, un allèle du gène *Silver*, caractérise la race Charolaise (Oulmouden et al., 2001). Il s'agit d'une mutation qui affecte le peptide signal de la protéine Silver et qui expliquerait la couleur blanc crémeux

de la robe de tous les animaux de la race Charolaise mais aussi le facteur de dilution longtemps décrit chez cette même race.

Ce manuscrit présente le travail effectué au cours de ma thèse. Il est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre présente un exposé bibliographique relatif à la pigmentation chez les mammifères, dont une partie est dédiée au facteur de transcription *Mitf* qui est situé au cœur des voies de régulation de la survie et de la différenciation des mélanocytes. La troisième partie de ce chapitre, est consacrée à la génétique de la coloration bovine. La dernière partie de ce chapitre présente des données de travaux sur le gène *Silver* dont l'homologue bovin constitue une partie de mes travaux. Le deuxième chapitre présente le projet de thèse et les matériels et méthodes mis en œuvre. L'ensemble des résultats obtenus lors de ma formation doctorale sont exposés sous forme d'un troisième chapitre : la première partie décrit les résultats relatifs à l'obtention de souris transgéniques porteuses des allèles du gène *Silver* bovin et la deuxième partie présente l'aspect *in vitro* de la même problématique. La dernière partie présente une contribution à l'étude du changement de couleur chez la race bovine Gasconne.

# *Chapitre I*

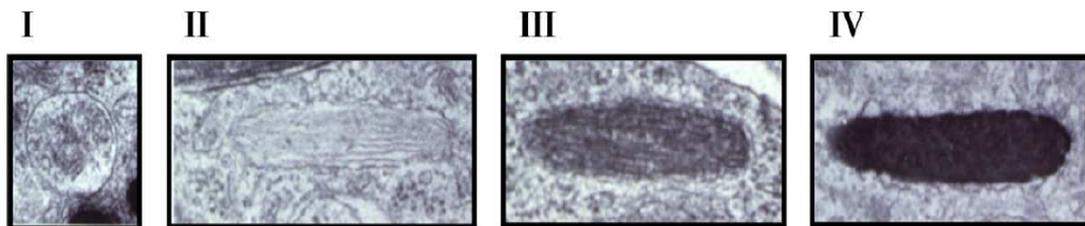


# I. Exposé bibliographique

## I.1 La pigmentation chez les mammifères

### I.1.1 Les mélanocytes et les mélanosomes

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la production des mélanines. Au cours de l'embryogenèse, on distingue la formation de deux types de mélanocytes. Celles originaires de la crête neurale, occupent des régions spécifiques de l'embryon de souris en développement : l'épiderme, le bulbe du poil, l'oreille interne, l'iris et la choroïde de l'œil (Jiao *et al.*, 2006). En revanche les cellules pigmentées formant l'épithélium pigmentaire de la rétine de l'œil (RPE) proviennent du neurectoderme. Les mélanocytes varient en taille et en forme selon leur densité. Dans des régions présentant de faible densité, les mélanocytes possèdent de longues dendrites. Par ailleurs, en régions de haute densité, les mélanocytes sont plus arrondis avec de courtes dendrites. Les granules de mélanine sont produits dans des organites apparentés aux lysosomes (LRO), spécifiques aux mélanocytes : les mélanosomes. Le mécanisme de la biogenèse du mélanosome proposé par Seiji *et al.* en 1963, a été confirmé plus tard par d'autres travaux (Basrur *et al.*, 2003; Kushimoto *et al.*, 2001). Celui-ci se déroule en quatre stades : prémélanosome ou mélanosome stade I qui présente une forme quasi-sphérique et une matrice amorphe (Figure 1). Le mélanosome au



**Figure 1 : illustration des quatre stades (I, II, III et IV) de la biogenèse du mélanosome (Hearing *et al.*, 2005)**

stade II acquiert une forme ovoïde allongée avec la formation d'une structure interne fibrillaire. Au stade III, le dépôt de mélanine, synthétisé par les enzymes de la famille tyrosinase (Tyr, Trp1 et Trp2), sur la structure fibrillaire, est évident et atteint son maximum en stade IV où plus aucune structure interne n'est visible. Tout au long de leur synthèse, les mélanosomes sont transportés aux dendrites où ils sont transférés aux

kératinocytes, pour être livrés ensuite au poil en phase de croissance. En revanche, les mélanocytes de la choroïde, l'iris et du RPE gardent leurs mélanosomes.

Les mélanosomes sont classés en deux types : les eumélanosomes noirs ou bruns et les phéomélanosomes sphériques qui résultent de l'incorporation d'un résidu cystéine et sont de couleur jaune ou rouge (Yamaguchi *et al.*, 2005). L'eumélanine est un polymère hétérogène insoluble constitué d'un mélange de 5,6-dihydroxyindole (DHI), de 5,6-dihydroxylindole-2 acide carboxylique (DHICA) sous forme réduite et oxydée, et des unités pyrrole dérivées de leur clivage peroxydative. La phéomélanine, soluble en milieu alcalin, est constituée principalement de dérivés benzothiazine sulfurés (Prota *et al.*, 1992 ; Potterf *et al.*, 1998). L'eumélanine et la phéomélanine dérivent toutes les deux d'un précurseur L-tyrosine et ont initialement une voie métabolique commune : la tyrosine est hydroxylée en position 3' en dihydroxypenphenylanine (dopa) qui, à son tour, est oxydée en dopaquinone (Figure 2).

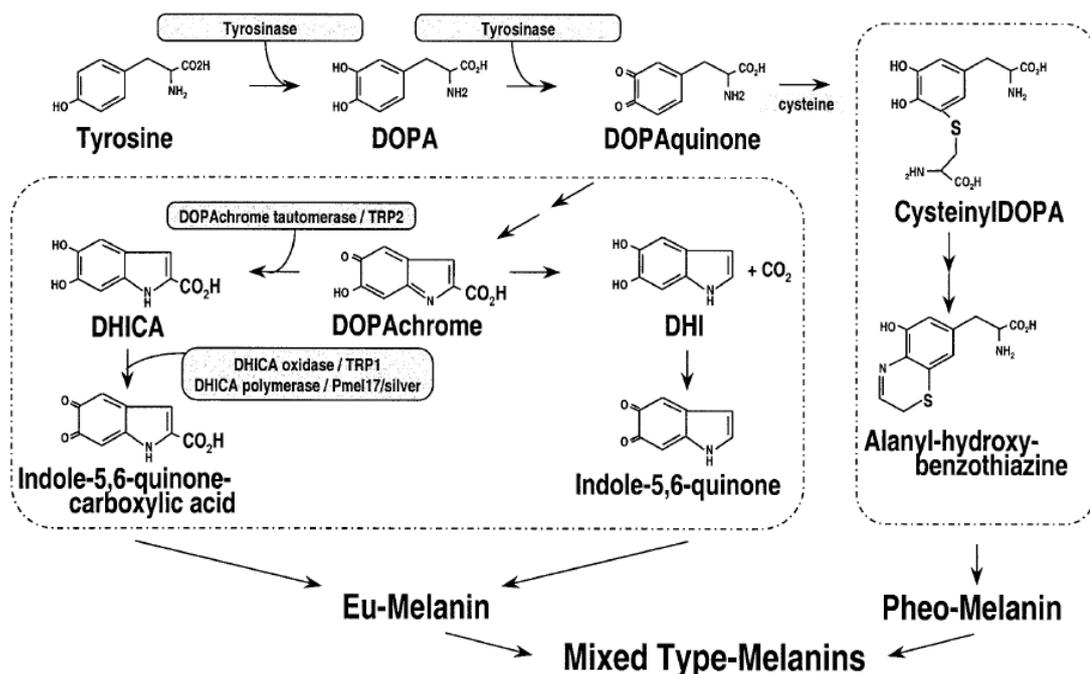


Figure 2 : la biosynthèse de mélanines (Potterf *et al.*, 1998)

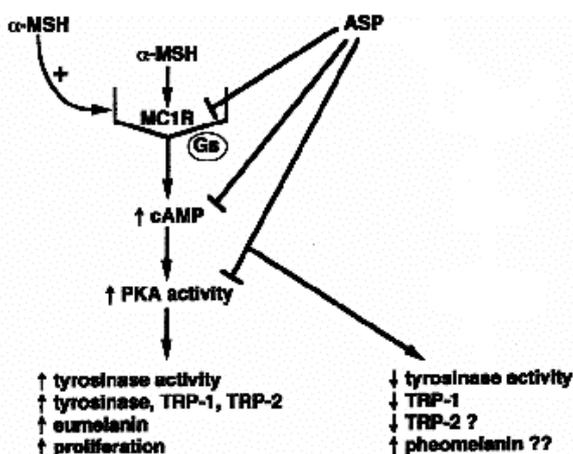
Ces deux étapes sont catalysées par la tyrosinase (EC 1.14.18.1), l'enzyme clef dans la biosynthèse des mélanines. La première étape limitante est lente et irréversible. Par contre, la réaction d'oxydation en dopaquinone est rapide et réversible. En absence de tout composant enzymatique, la dopaquinone se cyclise rapidement, se décarboxyle, s'oxyde et

se polymérise pour former le DHI, un polymère noir insoluble de haut poids moléculaire. Cependant, deux autres enzymes de la famille tyrosinase Trp1 (Tyrosinase-Related Protein 1) et Trp2 (Tyrosinase-Related Protein 2), connue aussi sous le nom de Dct (dopachrome tautomérase), ont une fonction catalytique et peuvent modifier le produit mélanique. En effet, la dopachrome, en présence de Dct, conduit à une tautomérisation qui est suivie par une oxydation et polymérisation plus lente, pour produire la DHICA au lieu de la DHI, un produit moyennement soluble de poids moléculaire inférieur à celui de DHI et de couleur plus claire. Chez la souris, Trp1 est capable de réguler l'oxydation de DHICA (Kobayashi et *al.*, 1994).

### I.1.2 Régulation de la mélanogénèse

Dans les mélanocytes folliculaires de souris, la régulation du « switch » entre la synthèse d'eumélanine, pigment noir ou brun foncé, et la phéomélanine, pigment rouge-jaune, est orchestrée respectivement, par l'hormone stimulante des mélanocytes, l' $\alpha$ -MSH, et la protéine de signalisation Agouti (Asp) (Silvers, 1979 ; Prota et *al.*, 1992).

Le mécanisme d'action de l' $\alpha$ -MSH implique sa fixation sur son récepteur spécifique, Mc1r (récepteur des mélanocortines), produit du gène *Extension* (Suzuki et *al.*, 1996). Mc1r est un récepteur à sept domaines transmembranaires de la famille des récepteurs couplés à cinq protéines G différentes (Mountjoy et *al.*, 1992 ; Chhajlani et *al.*, 1992). La fixation de l' $\alpha$ -MSH sur ce dernier entraîne l'activation de l'adénylate cyclase et, par la suite, d'une augmentation du taux d'AMPc (Figure 3). La voie AMPc va activer l'expression de trois enzymes de la famille tyrosinase et favoriser la production d'eumélanine par rapport à la phéomélanine.



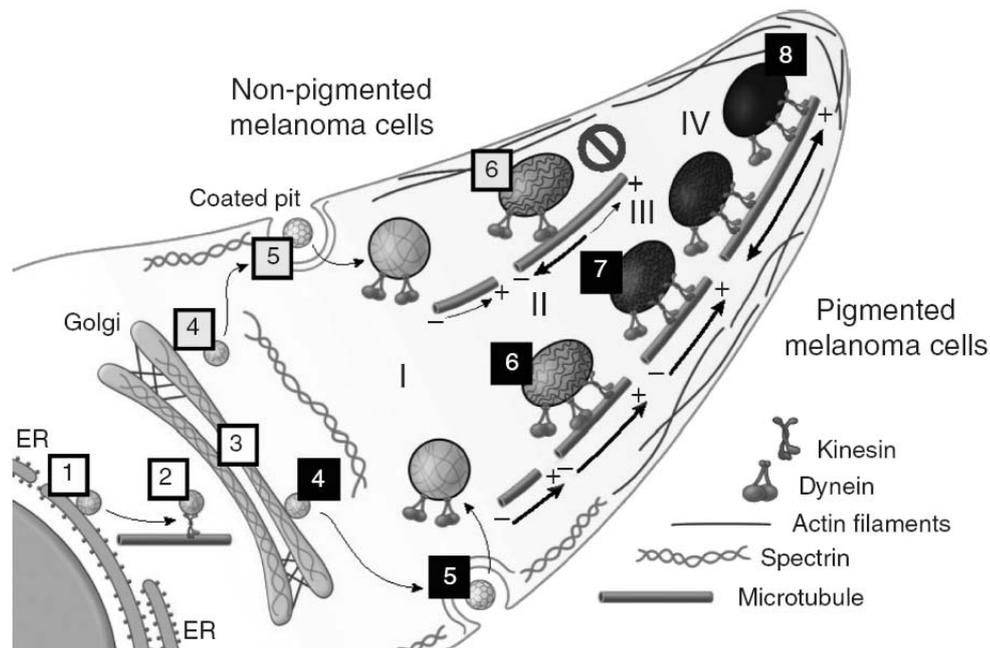
**Figure 3 : la voie de signalisation Mc1r.**  $\alpha$ -Msh et Asp ont des effets antagonistes sur l'expression des gènes de la mélanogénèse. La fixation de  $\alpha$ -Msh, favorise la synthèse des eumélanines, alors que celle d'Asp favorise la synthèse des phéomélanines (Abdel-Malek et *al.*, 2000 : modifié)

Plusieurs mutations du gène *Mclr* ont été identifiées, ainsi que leurs conséquences sur le fonctionnement du récepteur, et le phénotype pigmentaire. Chez la souris *e/e* (*yellow*), la couleur jaune du pelage est due à un SNP non-sens en position 549 en aval du codon de l'initiation qui induit un codon stop précoce. Le récepteur muté, devient incapable de transmettre la signalisation *via* l'activité adénylate cyclase (Robbins et *al.*, 1993). Chez la souris *sombre* ( $E^{so}/E^{so}$ ), une mutation ponctuelle induit une substitution d'un résidu Leucine en position 98 du deuxième domaine transmembranaire par un résidu Proline, engendrant la synthèse d'un récepteur constitutivement actif (insensible à la fixation de son ligand  $\alpha$ -MSH).

La protéine de signalisation Agouti est un antagoniste qui entre en compétition avec l'agoniste  $\alpha$ -MSH et l'empêche de se fixer sur *Mclr* (Suzuki et *al.*, 1997 ; Siegrist et *al.*, 1997). Des études *in vitro* ont montré que l'inhibition par Asp est observée à partir d'un ratio Asp :  $\alpha$ -MSH de 1 : 10. Chez la souris, des mutations dominantes du locus *Agouti* générant une surexpression d'Asp, entraînent une couleur jaune du pelage. En plus, d'autres anomalies ont été observées, notamment l'obésité et une anomalie de développement (Jones et *al.*, 1996).

### I.1.3 Le transport des mélanosomes

Au cours de la synthèse et de la maturation des mélanosomes au sein de mélanocytes épidermiques, ces organites sont transportés vers les extrémités des dendrites, en vue de leur transfert aux kératinocytes adjacents. Ce transport des mélanosomes est assuré *via* deux voies principales : dans un premier temps, les microtubules sont utilisés pour une motilité à grande échelle conduisant les mélanosomes matures jusqu'aux extrémités des dendrites mélanocytaires. Dans un deuxième temps, ils sont pris en charge par les filaments d'actine pour de courts mouvements, précédant leur transfert aux kératinocytes (Marks *et al.*, 2001).



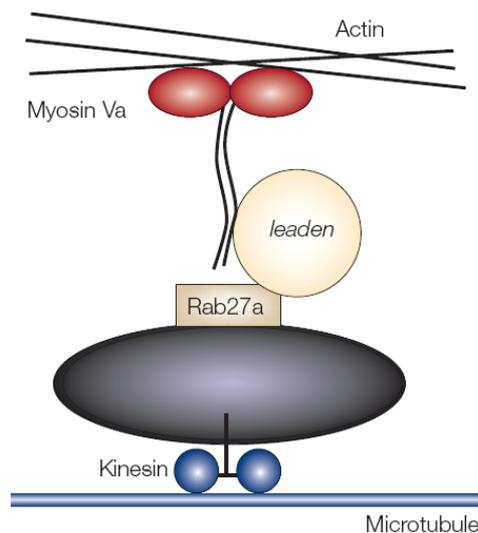
**Figure 4 : mouvement antérograde des vésicules de sécrétion et transport des mélanosomes dans des cellules non pigmentées (en haut) et pigmentées (en bas).** Des vésicules contenant des protéines mélanosomiques bourgeonnent du RE (1). Ces vésicules sont transportées par le complexe dynéine/dynactine via les microtubules jusqu'au cis-Golgi (2). Dans le Golgi la spectrine stabilise l'arrivée des différentes vésicules et continue le transport antérograde (3). La présence d'actine sur les deux extrémités des citernes golgiens sert de soutien et interagit probablement avec la spectrine. Au niveau du réseau trans-golgien (4), les vésicules de sécrétion contenant des mosaïques ressemblant à la spectrine, sont envoyées vers leur destination finale, conjointement à d'autres systèmes de transport et de bourgeonnement. La membrane plasmique est prise comme exemple dans ce schéma. Une nouvelle vésicule est donc internalisée (5) et dirigée vers le mélanosome au stade I (6). La présence de dynéines dans des mélanosomes aux stades I et II pourrait favoriser leur accumulation périnucléaire dans la cellule. En présence de kinésines il y a transport des mélanosomes tardifs (stades III et IV), tout au long des microtubules, en périphérie de la cellule, pour atteindre l'extrémité des dendrites (6). En stade final, les mélanosomes au stade IV seront pris en charge par les filaments d'actine pour transfert aux kératinocytes avoisinants (7). (Watabe *et al.*, 2008)

Le transport *via* les microtubules dépend de protéines motrices : la kinésine et la dynéine (Vallee et *al.*, 1988). Cette dernière, d'une localisation périnucléaire, est particulièrement présente dans les mélanosomes prématures, où la kinésine n'apparaît pas (Watabe et *al.*, 2008). A part son implication dans le transport rétrograde, elle joue une fonction bien définie dans la localisation, le mouvement des divers cargos, y compris les endosomes tardifs et les lysosomes. En plus de son rôle moteur pour les endosomes précoces, la dynéine contribue également à la fusion endosomale, surtout dans l'adressage des récepteurs.

La spéctrine est une protéine du cytosquelette qui interagit simultanément avec des protéines membranaires, des protéines cytosoliques et certains phospholipides, d'une manière directe ou indirecte, *via* des protéines adaptatrices (Ap), pour créer une matrice échafaudage (scaffold) multifonctionnelle. Elle se fixe également, sur tous les systèmes majeurs filamenteux et relie les membranes et les protéines du cytosol aux éléments du cytosquelette (De Matteis et *al.*, 2000). En plus de son rôle dans la sélection des cargos, dans l'interaction avec les vésicules recouvertes de clathrine au cours de l'endocytose et dans la voie de sécrétion précoce de l'interface RE-Golgi (Godi et *al.*, 1998), la spéctrine peut jouer un rôle dans la livraison des vésicules cargo aux organites cibles (Figure 4). Plus précisément, la spéctrine et la dynéine coopèrent ensemble pour retarder le tri et l'adressage des mélanosomes prématures en direction des dendrites, jusqu'à la fin de leur approvisionnement en protéines mélanosomiques, indispensables à leur maturation (Kural et *al.*, 2007 ; Hirobe et *al.*, 2007a,b,c et d). Les mélanosomes matures sont pris en charge par les microtubules, où ils suivent un mouvement antérograde, dirigé par les kinésines jusqu'aux dendrites.

Les acteurs de la voie actine ont été identifiés par des mutations phénotypiques. Dans les mélanocytes normaux, les mélanosomes sont distribués entre le cytoplasme et les dendrites en périphérie. En revanche, les mélanosomes mélanocytaires des patients qui souffrent du syndrome de Griscelli, mais aussi du modèle murin *ashen* (*Rab27a<sup>ash</sup>*), présentent un profil de distribution périnucléaire (Hume et *al.*, 2001). Deux autres souris mutantes présentent une dilution de couleur et un phénotype similaire. La première est la souris *dilute* (*Myo5a<sup>d</sup>*), dont le phénotype résulte de mutations identifiées dans le gène codant pour la myosine Va. La deuxième est la souris *leaden* (*Mlph<sup>ln</sup>*), dont l'allèle muté a été identifié (Mercer et *al.*, 1991). La similitude des trois phénotypes confirme une voie d'action commune dans le transport du mélanosome, probablement en ancrant ce dernier à l'actine périphérique. Plusieurs observations confortent cette hypothèse. Tout d'abord, le

phénotype dû aux trois mutants est supprimé par la même mutation *dilute suppressor*. Ensuite, la Myosine Va co-immunoprécipite avec Rab27a dans des extraits mélanocytaires. Enfin, l'association de la Myosine Va avec les mélanosomes est très réduite dans des cultures de mélanocytes *ashen* ou *leaden*. Rab27a, au contraire, est correctement localisée sur le mélanosome, en absence de Mlph ou de myosine Va. Par conséquent, l'adressage de Rab27a est indépendant de myosine Va et de Mlph. Son action peut se faire avec ou à travers Mlph, pour permettre le recrutement de myosine Va au sein des mélanosomes, ainsi que leur rétention sur l'actine périphérique du cytosquelette (Hume et *al.*, 2001). De plus, Mlph appartient à une famille de protéines partenaires de Rab27a, et joue le rôle d'effecteur en se fixant à la fois sur Rab27a et myosine Va, *via* deux régions distinctes : le N-terminal et le cœur de la molécule (Figure 5).



**Figure 5 : mécanisme moléculaire du transport des mélanosomes par le complexe tripartite ; Myo Va – Leaden (Mlph) – Rab27a (Marks et *al.*, 2001)**

#### **I.1.4 Le transfert des mélanosomes**

Le mécanisme de transfert des mélanosomes et/ou de mélanines, à partir des mélanocytes de la peau et du follicule vers les cellules kératinocytes adjacentes est peu connu. La plupart des connaissances sont basées sur des études *in vitro*, de co-culture des deux types cellulaires (Scott et *al.*, 2002). Quatre modes de transfert ont été proposés (Van

Den Bossche et *al.*, 2006). Le premier appelé « cytophagocytose » implique la phagocytose des extrémités dendritiques par les kératinocytes, et ainsi les granules de mélanines sont dispersés dans le cytoplasme. Le second appelé « fusion » met en jeu le transfert physique des mélanosomes *via* un canal de communication intercellulaire nommé « Filopodia » (Scott et *al.*, 2002). Le troisième implique l'exocytose des mélanines du mélanocyte suivie de l'endocytose au niveau des kératinocytes. Enfin, le mode de transfert *via* des vésicules membranaires, consiste en l'export des mélanosomes dans des vésicules membranaires qui fusionnent avec la membrane plasmique des kératinocytes, ou bien elles sont ingérées par phagocytose. Dans les deux cas les mélanines se retrouvent dans les kératinocytes.

Après transfert, les mélanines sont transportées vers la face apicale du noyau afin de protéger le matériel génétique contre les lésions causées par le rayonnement ultraviolet. De nombreux facteurs, impliqués dans le mécanisme de transfert, ont été identifiés. Par-2 (Proteinase-Activated Receptor 2) appartient à la famille des récepteurs activés par des sérines protéases, qui clivent le domaine amino-terminal extracellulaire et engendrent son activation. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la stimulation de ce récepteur augmente le taux de la phagocytose par les kératinocytes et conduit à un niveau de transfert de mélanines élevé (Seiberg et *al.*, 2000 ; Paine et *al.*, 2001). De part son rôle dans la phagocytose, Par-2 agit sur la pigmentation de la peau en stimulant la formation des dendrites mélanocytaires. En effet, suite à leurs stimulations, les prostaglandines Pge2 et Pgf2a, sont secrétées par les kératinocytes dans le milieu intercellulaire. Elles se fixent sur les récepteurs mélanocytaires, Ep1, Ep3 et Fp, pour induire la formation de dendrites (Scott et *al.*, 2004). Par ailleurs, les cadhérines semblent jouer un rôle majeur dans l'adhésion mélanocyte-kératinocyte. En effet, la E-cadhérine et la P-cadhérine sont exprimées dans les mélanocytes humains et entraînent leurs adhésions aux kératinocytes calcium-dépendant. Il existe d'autres récepteurs comme les lectines impliquées dans cette adhésion (Van Den Bossche et *al.*, 2006). Ces dernières se fixent sur des sucres présents à la surface intermembranaire.

## I.2 Mitf : un déterminant des mélanocytes

Le gène *MITF* est conservé chez plusieurs espèces de vertébrés : la souris, le rat, le poulet et l'homme. Chez l'homme, il est localisé sur le bras court du chromosome 3 en 3p14.2. Il code un facteur de transcription appartenant à la superfamille Myc, un facteur de transcription dimérique, basique de type hélice-boucle-hélice leucine zipper (b-HLH-Zip). Certaines mutations du gène *MITF* sont associées à la Microphthalmie ; une diminution des dimensions de l'oeil dans ses différents diamètres, due à une anomalie congénitale ([www.vulgaris-médical.com/encyclopédie](http://www.vulgaris-médical.com/encyclopédie)). Mitf, se fixe à l'ADN au niveau d'une séquence consensus E-box canonique (CA[C/T]GTG), et une séquence palindromique CACATG (Yasumoto et *al.*, 1994). Plusieurs facteurs de transcriptions de type b-HLH-Zip (Eb, Tfe3 et Tfec) peuvent former un hétérodimère avec Mitf et se fixer sur l'ADN. Cette famille d'hétérodimères est connue sous le nom de MiT. Mitf peut former également des homodimères reconnaissant l'ADN.

Le gène *MITF* possède 9 promoteurs alternatifs, dirigeant l'initiation d'isoformes spécifiques. Le promoteur M est spécifiquement exprimé dans les mélanocytes et code l'isoforme M. Il est reconnu par plusieurs facteurs de transcription importants pour la signalisation et le développement de la crête neurale : Paired box gene 3 (Pax3), cAMP-responsive element binding protein (CREB), Sry (sex-determining region Y)-box 10 (Sox10), lymphoïde enhancer binding factor 1 (Lef1), one cut domain 2 (Onecut-2) et Mitf-M lui-même. Tous ces facteurs sont impliqués dans la régulation du promoteur MITF-M. Plusieurs voies de régulation de MITF-M ont été étudiées. La voie Mc1r : l' $\alpha$ -MSH se fixe sur son récepteur Mc1r, ce qui induit l'activation de l'adénylyl cyclase, suivi par la production d'AMPc (Price et *al.*, 1998). L'AMPc conduit à la phosphorylation de CREB, qui à son tour va induire l'activation du promoteur MITF-M. Bien que la régulation AMPc-CREB soit ubiquitaire, l'action de CREB sur MITF-M requiert une coopération entre CREB et Sox10 (Huber et *al.*, 2003). L'expression de ce dernier est restreinte aux régions dérivées de la crête neurale. La voie wingless-type (Wnt) : est cruciale pour la différenciation des mélanocytes de la crête neurale. La fixation des protéines Wnt sur le récepteur Frizzled induit une interaction entre la  $\beta$ -caténine et le facteur de transcription Lef1, qui induit alors l'activation du promoteur MITF-M (Schepsky et *al.*, 2006 ; Takeda et *al.*, 2000). Pax3, lui aussi, active le promoteur MITF-M et pourrait répondre à la signalisation d'interleukine, dont le mécanisme est peu connu. Outre ces voies de régulation

transcriptionnelles, on peut noter l'existence d'une régulation par modifications post-traductionnelles de Mitf-M. On peut citer la phosphorylation par différentes kinases : Mapk (Mitogen-Activated Protein Kinase), Rsk (Ribosomal S6 Kinase), glycogen synthase kinase-3 $\beta$  et p38. Ces kinases occupent des voies de signalisation variées et en réponse à des signaux environnementaux, peuvent moduler l'activité transcriptionnelle de *MITF*. La voie (c-kit) : l'activation de c-kit consiste en la phosphorylation de Mitf en position Ser73 par Erk2 (extracellular regulated kinase-2) et en position Ser409 par p90rsk (p90 ribosomal S6 kinase). La phosphorylation en Ser73 augmente le recrutement de CREB binding protein Cbp. Simultanément, Mitf phosphorylé peut être la cible de la protéolyse ubiquitine-dépendante. La sumoylation de Mitf par Pias3 [une protéine inhibitrice de Stat3 activé (Transducteur de Signal et Activateur de la Transcription)], affecte son activité transcriptionnelle [La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou de plusieurs protéines Sumo (*Small Ubiquitin-like Modifier*), sur une Lysine acceptrice de la protéine cible]. Pias3 et Pkc1 (protéine kinase C 1) inhibent chacun l'activité transcriptionnelle de Mitf. Dans le cas de Pias3, son interaction avec Mitf phosphorylé en Ser73 inhibe sa fixation sur l'ADN en catalysant la réaction de liaison à une protéine Sumo. La phosphorylation de Ser409 atténue cette inhibition (Miller et al., 2005).

L'importance de Mitf, dans le développement des mélanocytes, a été confortée par deux expériences clefs. Dans une première expérience, Tachibana et al., ont réalisé une transfection stable de fibroblaste NIH/3T3 avec l'ADNc MITF-M, spécifique des mélanocytes. Ces cellules ont acquis une transformation morphologique en cellules dendritiques, et expriment des gènes spécifiques des mélanocytes, *Tyr* et *Trp1* (Tachibana et al., 1996). Deuxièmement, la transfection de cellules neurorétines de poulet avec l'ADNc de Mitf-M, induit la production de pigment et l'expression du gène *Qnr-71* (Quail Neuroretina clone 71), indiquant une transdifférenciation de cellules neurales en cellules pigmentaires (Planque et al., 1999). Par conséquent, Mitf apparaît être un régulateur principal du développement et de la différenciation des mélanocytes.

Mitf-M régule l'expression de plusieurs gènes de la pigmentation, y compris *TYR*, *TRP1*, *TRP2*, *MC1R*, *SILV/PMEL17* et *MART1/MLANA* (Du J. et al., 2003 ; Steingrimsson et al., 2004). Les régions promotrices de ces gènes ont en commun une M-box, une séquence de 11 pb qui contient un élément-cis « E-box », reconnu spécifiquement par Mitf-M et induisant l'activation de son promoteur.

Chez l'homme, des mutations affectant *MITF* sont à l'origine du syndrome de Waardenburg (WS) type IIA, une maladie autosomale dominante (Tassabehji et al., 1994).

Les patients souffrent d'une surdité et d'une anomalie de la pigmentation, dues à un déficit de la concentration des mélanocytes présents dans l'œil, et l'oreille interne. Ceci suggère un rôle potentiel des mélanocytes de la strie vasculaire de cochlée de l'oreille interne dans le maintien d'une concentration stable de potassium extracellulaire dans le fluide endolymphatique. Les trois autres variants de ce syndrome causent un déficit mélanocytaire. En effet, les phénotypes WS type I et II sont engendrés par des mutations dans *PAX3*, un régulateur de l'expression du gène *MITF* présent dans la crête neurale, impliqué dans la modulation directe de l'activité du promoteur *MITF* (Watanabe et al., 1998 ; Tassabehji et al., 1994). *PAX3* affecte d'autres lignées que les lignées mélanocytaires, ce qui peut expliquer d'autres phénotypes non mélanocytaires qui s'ajoutent à ces deux types de syndrome. D'autres mutations dans les gènes *SOX10*, *ENDOTHELIN-1* et dans son récepteur, sont responsables du WS type IV caractérisé par des anomalies des mélanocytes et un déficit dans l'innervation entérique. Sox10 est un régulateur de *MITF*. La plupart de ces gènes associés à WS, sont liés à une régulation homéostatique de l'activité Mitf. Le lien entre l'*ENDOTHELIN-1* et *MITF* reste à déterminer.

Chez la souris, des mutations affectant *Mitf*, sont associées à un phénotype caractérisé par une surdité, une hyperdensité osseuse, des yeux de taille réduite et une absence de pigment de l'œil et de la peau. *Mitf* non-fonctionnel cause une perte totale de la couleur. Par ailleurs les hétérozygotes présentent soit un phénotype non pigmenté soit un ventre blanc (white-belly spot), en fonction de la mutation (Steingrimsson et al., 2004 ; Hodgkinson et al., 1993). L'hétérozygotie associée au phénotype white-belly est due à des mutations du domaine basique de la protéine Mitf, responsable de sa fixation à l'ADN. Ces mutations affectent la survie et la migration des précurseurs mélanocytaires de la crête neurale. Mitf apparaît être nécessaire chez l'adulte ; cette donnée est renforcée par le fait que l'existence d'allèles hypomorphiques chez la souris causent une mortalité postnatale et un grisonnement précoce. Une seule mutation (*Mitf<sup>b</sup>*) a été décrite comme ayant un effet spécifique sur la coloration ; l'animal est de couleur brune. L'importance du facteur Mitf a été montrée dans les cellules mélanocytaires souches. Ces dernières représentent une population réserve (stock) de mélanocytes non différenciés, localisée dans le bulge du poil. Le mutant (*Mitf<sup>vit</sup>*) présente un grisonnement accéléré du poil dû à une perte précoce des cellules mélanocytaires souches (Nishimura et al., 2005).

A)



B)



C)



**Figure 6 :** A) Taureau de race Limousine B) Taureau de race Charolaise. C) Vache Simmental

### I.3 La pigmentation chez le bovin

La variation de la couleur de la robe des animaux, a toujours été d'un grand intérêt pour l'homme, comme en témoigne la présence de peintures de bovidés représentés avec des taches blanches dans la grotte Lascaux 17000 ans A.J.C. (Olson et *al.*, 1999). Dans les années 1800, quand certaines races anglaises se sont développées, les éleveurs ont essayé de créer des races possédant des profils de couleur et de tache uniformes, attestant de leur identité raciale. En l'absence des données scientifiques, ce type de caractérisation des races bovines est basé sur l'association de la couleur avec la production et l'adaptation environnementale (Russo et *al.*, 2004). Le patron standard d'une coloration de robe non-tachetée est tout simplement une pigmentation solide ou une absence de taches. Par ailleurs, l'Aurochs « *Bos Primigenius* » de l'Europe, ancêtre sauvage de la plupart voir la totalité des races des *Bos taurus*, semble être le plus approprié (Olson et *al.*, 1980). L'Aurochs, présentait une couleur variant du rouge-brun au brun-noir avec un museau tanné. De plus, il devait exister une variation de la couleur de certaines parties noires du corps et le mâle était plus sombre. De la même façon, les animaux présentant un phénotype de couleur sauvage ont tendance à avoir les extrémités plus sombres (la tête, la nuque, les pattes et la croupe). Ces couleurs caractéristiques sont observées d'une manière similaire chez certaines races actuelles (ex : Brune des Alpes). La plupart des variants observés sont rouges ou noirs uniforme si on les compare par rapport au phénotype sauvage. D'autres couleurs de robe correspondent à une simple modification des trois couleurs basiques : noir, rouge-brun (sauvage) et rouge. En général, la variation de ces couleurs implique une dilution voire parfois une perte totale de la couleur. Le rouge clair de la Limousine témoigne du phénomène de dilution, et le blanc du Charolais est un exemple de la dilution extrême de la pigmentation (Figure 6). Ainsi, plusieurs loci sont proposés pour expliquer les variations de couleurs entre les races et les différents profils de taches.

#### I.3.1 Le locus *Extension* (*E*)

Le locus *Extension* est le facteur majeur des variations de coloration. Localisé sur le chromosome 18, il code le récepteur Mc1r (Klungland et *al.*, 1995 ; Robbins, 1993). Trois allèles ont été définis pour ce locus :  $E^D$ ,  $E^+$  et  $e$ .  $E^D$  engendre un phénotype noir à transmission dominante,  $E^+$  est l'allèle sauvage responsable de la pigmentation rouge ou

rouge-brun et noire, et  $e$  est l'allèle rouge récessif. Ces allèles présentent un ordre de dominance complète  $E^D > E^+ > e$ . En effet, les animaux  $e/e$  sont rouges, les individus  $E^D/E^+$  sont typiquement noirs, les individus  $E^+/e$  tendent vers le rouge et les individus  $E^+/E^+$  peuvent être de couleur variable entre le rouge et le noir du fait que  $E^+$  code pour un récepteur fonctionnel, ce qui autorise la transduction du signal. L'allèle  $E^D$  correspond à une substitution, d'une Thymines par une Cytosine en position 296 de la partie codante du gène *Mclr*, ce qui produit un changement d'un 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 la race Prim'Holstein par exemple. L'allèle  $e$  se caractérise par la délétion d'une Guanine en position 310 de la partie codante et produit une protéine tronquée, inactive par décalage du cadre de lecture (Joerg *et al.*, 1996 ; Klungland *et al.*, 1995). Cette forme de récepteur, ne peut pas être stimulée par l' $\alpha$ -MSH, il n'y a donc pas augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et de fait pas de stimulation de la production d'eumélanine. Cet allèle est retrouvé, entre autres, chez la race Limousine, Blonde d'aquitaine et Charolaise. L'intensité du rouge varie entre ces races du fait de l'implication d'autres facteurs. Un quatrième allèle  $E^l$  a été identifié chez la race Gasconne et Aubrac (Rouzaud *et al.*, 2000) et correspond à une insertion de 12 pb en position 669 de la partie codante. Il induit une duplication de quatre acides aminés dans la troisième boucle cytoplasmique du récepteur, connue pour interagir avec les protéines G dont la conséquence phénotypique est inconnue. Des études fonctionnelles réalisées pour étudier l'expression des allèles  $E^+$  et  $E^l$  dans des cellules embryonnaires de reins humains (HEK293), ont montré un niveau d'AMPc plus élevé dans le cas de  $E^l$  que de  $E^+$  (Graphodatskaya *et al.*, 2002). Cette variation du niveau AMPc indépendante du niveau transcriptionnel des deux allèles, découle sans doute de la nature moléculaire du récepteur  $E^l$ . Par conséquent, l'expérience a montré la fonctionnalité des deux types de récepteurs avec une suractivité de l'un ( $E^l$ ) par rapport à l'autre ( $E^+$ ). Bien que le niveau d'AMPc dans un cas soit plus élevé que dans l'autre, ceci n'a pas une grande incidence sur le rapport de taux de pigments phéomélanine/eumélanine entre deux groupes d'animaux portant chacun l'un des deux allèles.

### **I.3.2 Le locus *Agouti* (A)**

Plusieurs auteurs ont tenté de repérer chez le bovin des mutations au locus *Agouti* comme décrites chez d'autres espèces (Adalsteinsson *et al.* 1995 ; Lauvergne, 1966 ; Olson

et *al.*, 1982 ; Searle, 1968). En effet, des mutations décrites dans le locus *Agouti* induisent une modification de l'expression du profil de coloration sauvage ( $E^+$ ). Il a été suggéré que l'allèle ( $a^l$ ) pouvait être responsable du ventre clair des races Limousine et Jersey. De plus, les modifications du profil sauvage observées dans le cas des races, brune des Alpes, Brahman et Chianina sont dues à un deuxième allèle ( $a^w$ ). De même en 1995, l'équipe d'Adalsteinsson a présenté des données appuyant l'existence d'un allèle noir récessif ( $a$ ) au même locus ( $A$ ). Les animaux sauvages présentant l'allèle ( $a$ ) à l'état homozygote acquièrent une couleur noire unie. L'allèle sauvage ( $A^+$ ) permet l'expression combinée de pigments rouges et noirs du pelage sauvage. L'allèle ( $a$ ) sous forme homozygote, n'a aucun effet sur la couleur en présence des génotypes  $e/e$  ou  $E^D/-$  pour le locus ( $E$ ). De plus l'allèle ( $A^{pb}$ ), est décrit comme étant responsable de la modification de la couleur et de l'extension du pigment noir chez les animaux sauvages, les rendant presque noirs (Majeskie, 1970). L'effet de cet allèle ne semble pas être affecté par le sexe de l'animal. Cet allèle est probablement responsable du profil noir observé parfois chez des croisés de Jersey, brune des Alpes et Brahman avec des races rouges (Olson, 1999). Le seul allèle dont la nature moléculaire est connue est  $A^{br}$ . Ce dernier a été identifié, chez la race Normande. Il correspond à l'insertion d'une séquence LINE dans la région située entre le promoteur spécifique de la peau et l'exon 1 du gène *Agouti*. Cet allèle est associé à la Bringeure (Brindle) de la race Normande (Girardot et *al.*, 2006). Le phénotype de bringeure 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. La couleur du « fond » (entre les bandes) varie du rouge clair au brun foncé ou même blanc en fonction d'allèles présents sur d'autres loci. Ces bandes de bringeure sont observées chez les races Texas Longhorn, et la Normande mais aussi dans les programmes de croisement entre races, plus particulièrement ceux comprenant les races Zébu. L'expression phénotypique de l'allèle ( $A^{br}$ ) responsable de la bringeure, requiert un allèle sauvage du gène *Mc1r* ( $E^+/E^+$  ou  $E^+/e$ ). *Agouti* apparaît hypostatique par rapport au gène *Extension* (*Mc1r*). Par conséquent les animaux  $e/e$  dépourvus de pigment noir, n'expriment pas les bandes noires du patron de la bringeure. De plus, l'allèle ( $A^{br}$ ) est incapable de modifier la couleur noire du pelage due à l'allèle  $E^D$ . Enfin, pour expliquer les variations du niveau de bringeure entre les animaux, Olson émet l'hypothèse suivante : les régions de bringeure sont limitées aux régions qui auraient été marrons foncées ou noires si l'animal n'avait pas l'allèle ( $A^{br}$ ) (Olson, 1999). Ces régions correspondent à une forte influence de l' $\alpha$ -MSH et de l'allèle ( $E^+$ ).

### **I.3.3 Le locus *Albinos* (C)**

Chez les mammifères, les mutations au locus albinos (C) sont très répandues. Leur principale caractéristique est de faire disparaître plus ou moins complètement, selon l'allèle, les pigments mélaniques de la peau, du poil et des yeux. L'albinisme a été décrit à plusieurs reprises chez le bovin. Les deux races où il a été décrit le plus en détail, sont les races Frisonne Pie Noire (Prim'Holstein) et Brune des Alpes (Weber et *al.*, 1964). Chez la race Frisonne Pie Noire, l'albinisme s'est manifesté aux Etats unis et au Japon sous forme incomplète : avec l'âge une coloration se développe au niveau de l'iris puis devient grisâtre, et au niveau des taches normalement noires de la robe on observe un dessin particulier appelé « ghost pattern » (patron spectre); le déterminisme paraît être de type autosomal récessif et l'origine de la mutation semble unique (Cole et *al.*, 1934 ; Petersen et *al.*, 1944). Dans d'autres cas d'albinismes décrits on observe la même couleur des yeux que celle décrite précédemment sans le patron spectre (Weber et *al.*, 1964). Chez la race Brune des Alpes, l'albinisme correspond à une absence totale de pigment dans la peau, les muqueuses, le poil et les yeux. Les veaux albinos, manifestent une photophobie mais ont un développement normal. Aucune pigmentation n'apparaît avec l'âge, contrairement à ce qui se passe chez les veaux frisons. Des croisements ont révélé que le caractère « albinos » de ces animaux était monofactoriel autosomal récessif (Weber et *al.*, 1964). De nos jours, ces animaux ne sont pas conservés en raison de leur sensibilité à la lumière.

### **I.3.4 Le locus *Dun***

Ce locus « *Dun* » est responsable entre autres des couleurs de pelage des races, Brune des Alpes, Brahman, Chianina. Les couleurs de pelage de ces races sont liées à un éclaircissement de la pigmentation de base. En général, la pigmentation tend à être supprimée totalement sur le flanc de l'animal. De plus, la pigmentation rouge semble être plus touchée que la noire. En effet, les races Brune des Alpes, Brahman et Chianina, présentent une absence totale du pigment rouge. L'allèle mutant (*dn*) du gène hypothétique « *dun* » agit de la même manière que le mutant 'Chinchilla', *c<sup>ch</sup>*, connu chez d'autres espèces (Berge, 1961). Il présente un caractère récessif incomplet par rapport à l'allèle normal (*Dn<sup>+</sup>*). En effet, à l'état hétérozygote, un effet de (*dn*) sur la pigmentation rouge est décrit, mais son effet sur la pigmentation noire est réduit.

### I.3.5 Le locus *Dilute*

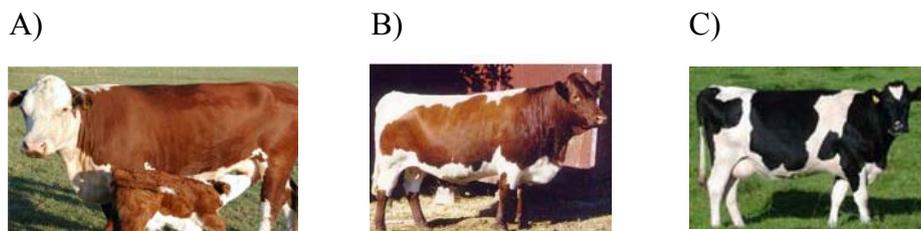
Les études liées à ce locus sont détaillées plus loin (I.4.6.7).

### I.3.6 Les mutations *White-spotting*

Le phénotype sauvage de white-spotting correspond à une absence de taches blanches, ce qui implique que n'importe quelle tache blanche (white-spotting) présente chez le bovin est due à un allèle mutant ou à une combinaison de plusieurs allèles mutants (Olson, 1980). En général, les mutations décrites dans la suite de ce paragraphe peuvent expliquer la génétique du white-spotting.

#### I.3.6.1 Les mutants du locus *S*

Chez la souris, le locus *S* ou « *piebald* » est connu pour son rôle dans la différenciation des mélanocytes au niveau de la crête neurale, ainsi que dans leur migration de la crête neurale vers le reste du corps (Jackson, 1994). Chez la souris, l'action du locus *S* induit la production de plusieurs profils white-spotting qui peuvent co-exister avec n'importe quel type de pigmentation. Chez le bovin, le locus présente au moins trois mutants en plus de l'allèle sauvage ( $S^+$ ) (non tacheté). L'allèle mutant ( $S^H$ ) à l'état homozygote, est responsable du patron de Hereford qui se caractérise par une face blanche (Figure 7A). L'allèle ( $S^P$ ), est responsable du patron Pinzgauer ou lineback (ligne blanche sur le dos) (Figure 7B) et l'allèle ( $s$ ), spotting récessif, est responsable du white-spotting irrégulier chez les races Holstein, Jersey, Simmental et d'autres (Figure 7C). L'ordre de dominance est le suivant :  $S^H = S^P > S^+ > s$ . Les mutations  $S^H$  et  $S^P$  sont dominantes.



**Figure 7 :** A) Vache de race Hereford. L'animal présente une face blanche ( $S^H$ ). B) Vache de race Pinzgauer présente une ligne blanche sur le dos ( $S^P$ ). C) Vache de race Holstein présente des taches blanches irrégulières ( $s$ ).

Ainsi, les animaux  $S^H/S^P$  issus de croisements Hereford x Pinzgauer, expriment à la fois une face blanche due à l'allèle  $S^H$  et, une bande dorsale blanche et un flanc blanc dus à l'allèle  $S^P$ . L'allèle récessif est présent chez la race Holstein. L'étendue des taches blanches des animaux  $s/s$  varie considérablement de 5 à 95% de la surface de la robe. Ces variations s'expliquent par des facteurs quantitatifs modificateurs de la quantité du blanc avec une fréquence d'héritabilité élevée ( $\sim 0,9$ ) (Briquet et al., 1947 ; Becerril et al., 1993). Par ailleurs, il existe des gènes quantitatifs modificateurs, qui peuvent moduler le degré d'expression des autres profils white-spotting. Par exemple, la proportion de blanc des animaux  $S^P/S^P$  ou  $S^P/S^+$ , peut dépasser celle observée chez la race Pinzgauer jusqu'au point de couvrir la totalité du postérieur et une partie de la moitié antérieure du corps : la pigmentation est limitée aux pattes, à la tête, aux côtés de la nuque et aux épaules. Des études de liaison génétique ont montré que le locus ( $S$ ) est localisé sur une région du chromosome 6 bovin. Le gène candidat, compris dans cette région de liaison, suggéré est *Kit* (Grosz et al., 1999 ; Reinsch et al., 1999). Ce dernier, code un récepteur tyrosine kinase impliqué dans le développement des mélanocytes en présence de son ligand Steel. Bien que chez la souris certaines mutations du gène sont associées au phénotype Dominant white spotting, aucune mutation n'a été décrite pour son homologue bovin (Dunn et al., 1937).

### **I.3.6.2 Les mutants *Blaze* (*Blason*)**

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).

### **I.3.6.3 Les mutants *Roan***

Le profil de coloration Roan, caractéristique des races Shorthorn et Blanc bleu belge, correspond à un mélange de poils blancs et colorés, sur au moins une partie du corps de l'animal hétérozygote ( $R/r^+$ ) pour ce locus. Les homozygotes pour ce locus sont blancs ( $R/R$ ) à l'exception des poils sur les oreilles, ou colorés ( $r^+/r^+$ ) mais ne présentent pas le mélange de poils des deux types. Ainsi le caractère Roan est le résultat de l'effet de codominance entre l'allèle ( $R$ ) exprimant le blanc et l'allèle ( $r^+$ ) exprimant la couleur. Des études de croisements ont montré que les deux loci *Roan* et *Extension* sont indépendants et

leurs localisations chromosomiques respectives sont sur les chromosomes 5 et 18 (Klungland et *al.*, 1995 ; Charlier et *al.*, 1996). Par conséquent, le caractère Roan peut apparaître sur des animaux rouges et noirs, ce qui a déjà été observé.

#### **I.3.6.4 Les mutants *Colour-sided* (flanc coloré)**

Le profil de couleur *colour-sided* (flanc-coloré) présent chez les races Texas Longhorn, Florida Cracker et d'autres races bovines est dû à un gène symbolisé par *Cs* (Wriedt, 1925). Ce même caractère a déjà été observé chez les yaks. L'expression de *Cs* est partiellement dominante, et persiste chez les bovins Cracker Florida, qui pendant de nombreuses générations ont été croisés avec des races non tachetées. Les hétérozygotes, partagent une bande blanche irrégulière sur les parties dorsales et ventrales de l'animal, avec des régions mimant Roan tout le long des bords et un patron Roan ou de taches blanches sur la tête. Les patrons de taches observés chez des animaux hétérozygotes pour cet allèle (*Cs*) diffèrent de ceux produits par *S<sup>P</sup>*. En effet les taches du premier (*Cs*) présentent des contours irréguliers de type Roan, contrairement aux taches (*S<sup>P</sup>*), qui présentent des contours bien définis. En général, les homozygotes pour *Cs* expriment le profil « White Park » qui tend vers une couleur blanche solide mais la pigmentation est présente sur les oreilles le museau et souvent au dessus des pattes (Olson, 1999).

### **I.3.6.5 Les mutants *Belted***

Il existe des mutants pour le gène *Bt*, qui présentent une ceinture blanche sur la partie médiane du corps, typique des races Dutch Belted des états unis et Belted Galloway de l'Ecosse (Figure 8). Ce caractère est dominant et les descendants issus de croisement, Belted x Holstein (*s/s*), présentent ce phénotype Belted. Comme c'est le cas de l'ensemble des patrons de spotting, des facteurs modificateurs sont responsables de la largeur et de l'uniformité de cette ceinture. De même, ce caractère est observé chez le porc et une région de liaison a été localisée au centromère du chromosome 8 dans cette espèce (Giuffra *et al.*, 1999). Le gène candidat proposé est *Kit*. Cependant, aucune mutation n'a été décrite jusqu'à présent.



**Figure 8 : un taureau de race Dutch Belted.**

### **I.3.6.6 Les mutants *Brockling***

Le locus Brockling, *Bc*, est impliqué dans la pigmentation de régions destinées à être blanches en l'absence de l'effet de ce gène (Olson, 1975). Le cas le plus commun de ce phénotype, est observé dans les croisements Hereford x Angus, où les descendants héritant un allèle (*Bc*) d'Angus présentent des taches pigmentées sur la face. Ces animaux possédant un allèle  $S^H$ , de Hereford sont sensés avoir une face entièrement blanche, ce qui montre une interaction de l'allèle (*Bc*) avec l'allèle  $S^H$ . Les animaux *s/s*, possèdent des pattes blanches, sauf en présence de l'allèle (*Bc*), les pattes sont pigmentées à un degré variable (Par ex : race Ayrshire). Le croisement Hereford ( $S^H$ ) avec des animaux porteurs de l'allèle (*Bc*),

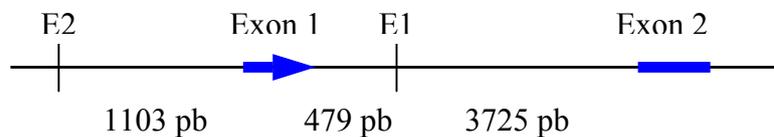
donne lieu à des descendants présentant un profil de pigmentation autour des yeux. Un effet protecteur du cancer des yeux, apporté par ce profil, a été montré (Anderson, 1991).



## I.4 Silver

### I.4.1 Le gène *SILVER/PMEL17*

Le gène *SILVER/PMEL17/GP100/gp87/RPE* humain est localisé sur le bras long du chromosome 12 à la position 12q13-q14 (Kubota et *al.*, 1995 ; Kim et *al.*, 1996). Il comprend 11 exons codants, séparés par 10 introns. L'organisation de ce gène est conservée chez différentes espèces incluant *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Equus caballus* et *Gallus gallus*. L'exon 1 contient le codon d'initiation de la traduction. La partie régulatrice de ce gène comprend deux éléments cis E-box (Figure 9). La première boîte E2 (CACGTG) se trouve à 1103 pb en amont du codon d'initiation (Du et *al.*, 2003). La deuxième boîte E1 (CACGTG) se trouve dans la région du premier intron à 479 pb en aval du premier exon. Des études fonctionnelles ont montré que seule la boîte E1 intronique est impliquée dans la régulation de l'expression du gène *SILVER*. Cette dernière est reconnue par Mitf un facteur de transcription essentiel pour le développement et la maintenance de la lignée mélanocytaire. Mitf joue un rôle crucial dans la régulation de la plupart des gènes de la coloration.



**Figure 9 : promoteur du gène *SILVER* humain.** Exon 1 (75 pb) et Exon 2 (110 pb). E1 et E2 : sites de fixation de Mitf (Du et *al.*, 2003)

### I.4.2 Le transcrit

Chez l'homme, deux transcrits de cellules mélanocytaires ont été décrits (Adema et *al.*, 1994 ; Bailin et *al.*, 1996 ; Kim et *al.*, 1996). Ces deux formes longues Pmel17-l et courtes Pmel17-i, diffèrent de 21 pb, du fait d'un site accepteur d'épissage alternatif dans l'exon 10 du gène *SILVER/PMEL17*. En 2003, Nichols et *al.* ont découvert un deuxième mécanisme d'épissage alternatif dans les cellules mélanocytaires, au niveau de l'exon 6. La protéine exprimée est tronquée au niveau de la région répétée du domaine luminal, ce qui peut potentiellement altérer l'oligomérisation dans les mélanosomes, le milieu naturel de la synthèse de mélanines.

Le transcrit Pmel17-i correspond à la forme majoritaire. La partie 5'UTR (région non traduite) de l'ARNm fait 30 pb et la séquence génomique en amont contient trois motifs : une TATA box, un élément OCT-1 et un motif SP-1 (Bailin et *al.*, 1996). Le 3' UTR est de 124 pb, et contient le signal de polyadénylation à 89 pb du codon stop.

### I.4.3 La protéine Silver / Pmel17

Chez l'homme, Silver est une protéine membranaire de type 1, possédant un peptide signal en N-terminal, un long domaine luminal (lumière du mélanosome), un domaine transmembranaire de 24 résidus et un domaine cytosolique de 45 résidus (Kwon et *al.*, 1987 ; Maresh et *al.*, 1994a et b ; Adema et *al.*, 1994).

Quatre protéines résultent de deux épissages alternatifs du pré-ARN messager, avec des domaines luminaux, de 525 aa, 532 aa, 567 aa et 574 aa. (Bailin et *al.*, 1996 ; Kim et *al.*, 1996 ; Nichols et *al.*, 2003). La forme 567 aa est prédominante dans la plupart des cellules mélanocytaires humaines. Pmel17 serait impliquée dans la conversion de DHICA en polymères de mélanines, ce qui diminue sa cytotoxicité (Lee et *al.*, 1996).

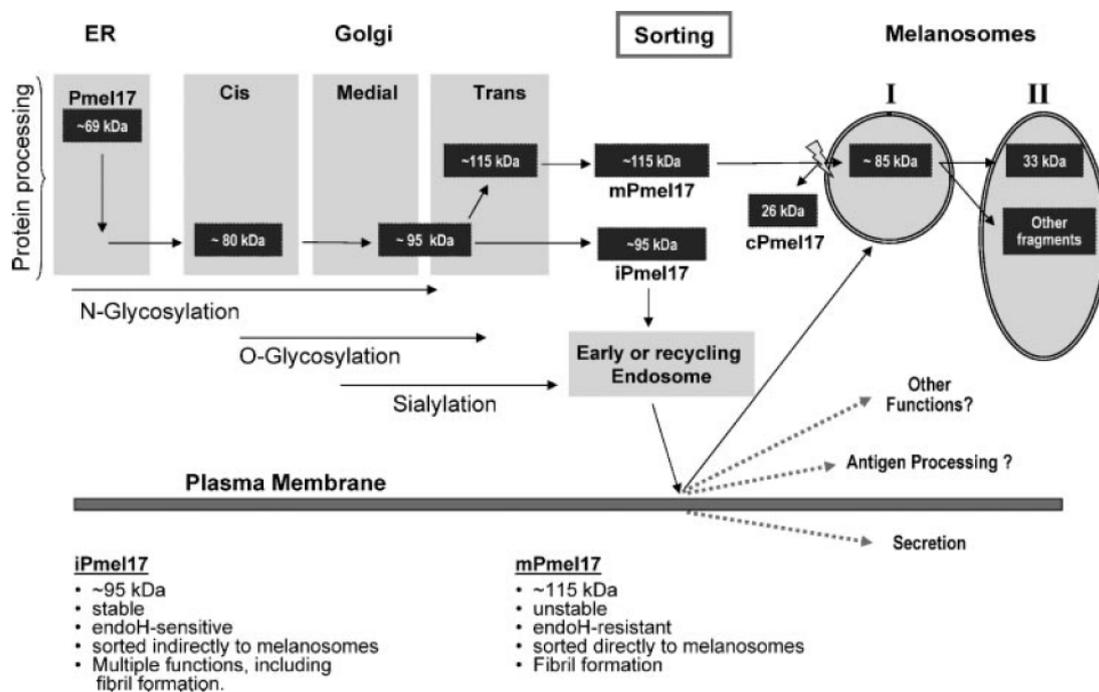


Figure 10 : le schéma de maturation et d'adressage de la protéine Silver (Valencia et *al.*, 2007)

#### I.4.4 Synthèse, trafic et adressage

La protéine humaine néosynthétisée « P1 », dans les microsomes, fait une taille de environ 69 kDa (Figure 10). Comme c'est le cas pour d'autres protéines transmembranaires de type 1, la séquence du peptide signal est clivée par une endopeptidase, et au moins 4 liaisons N-oligosaccharides sont ajoutées sur des sites consensus, en même temps que la traduction s'effectue dans le réticulum endoplasmique (Berson et *al.*, 2001 ; Maresh et *al.*, 1994b). Au moins une fraction de Silver traverse le Golgi, où quelques liaisons N-oligosaccharides sont modifiées par des enzymes résidentes dans le Golgi, les mannosidases et les glycosyl-transférases, en une forme plus complexe. *In vitro*, cette forme complexe est résistante à la digestion par l'endoglycosidase H. De même, des liaisons O-oligosaccharides sont ajoutées pour être élaborées et modifiées par l'acide sialique (Valencia et *al.*, 2007). A ce stade, on note deux formes de Pmel17 différant par leur niveau de O-Glycosylation : iPmel17 (immature) de 95 kDa et mPmel17 (mature) ou « P2 » de 115 kDa. (Maresh et *al.*, 1994b ; Valencia et *al.*, 2006b). Selon Valencia et *al.*, dans des cellules polaires comme les cellules mélanocytaires, la forme mPmel17 est transportée vers le prémélanosome ou mélanosome stade primaire *via* des vésicules recouvertes de clathrine (probablement AP1A). En revanche, la forme iPmel17 est acheminée vers les endosomes de recyclage pour gagner la membrane plasmique où différentes voies sont possibles : *i* voie de sécrétion, *ii* maturation d'un antigène, *iii* endocytose et transport jusqu'aux mélanosomes de stade primaire, *iv* autres fonctions inconnues. A un stade post-golgien du trafic, les deux formes protéiques mPmel17 et iPmel17 subissent un premier clivage réalisé par une proprotéine convertase dans un compartiment acide (les endosomes ou prémélanosomes), générant deux fragments M $\alpha$  et M $\beta$  de masses respectives ~ 85 kDa et ~ 26 kDa (Theos et *al.*, 2006 ; Berson et *al.*, 2003). Ces deux fragments, occupant la lumière du mélanosome, restent liés par un pont disulfure. Le fragment M $\beta$  est ancré à la membrane mélanosomique, *via* le domaine transmembranaire situé en son extrémité carboxy-terminal. Des études ont montré que la sous-unité M $\alpha$  subit des clivages dont les positions exactes demeurent inconnues (Harper et *al.*, 2008).

## **I.4.5 Les partenaires mélanosomiques de Silver/Pmel17**

### **I.4.5.1 Mart1/Mlana**

Chez l'homme, le gène *MART1* ou *MELAN-A* est localisé sur le bras court du chromosome 9 en position 9p24.1 et correspond à 18914 pb. Il présente un profil d'expression spécifique aux mélanocytes, aux mélanomes et à l'épithélium pigmenté de la rétine RPE (Kawakami *al.*, 1994). Mart-1 est une protéine membranaire de type III de 118 acides aminés avec une masse moléculaire apparente de 24 kDa. Des études réalisées par immunofluorescence et microscopie électronique, ont montré sa localisation dans le réticulum endoplasmique, le réseau trans-golgien, et les mélanosomes (De Mazière et *al.*, 2002). Bien que, Mart1 ne présente aucune homologie avec d'autres protéines du mélanosome et aucune activité enzymatique, son profil d'expression et son enrichissement dans les mélanosomes précoces (stade I et II) (Kushimoto et *al.*, 2001) suggèrent un rôle dans la mélanogénèse. Hoashi et *al.* ont montré une interaction *in vivo* entre Mart-1 et Silver par co-immunopurification et par colocalisation subcellulaire en immunofluorescence (Hoashi et *al.*, 2005). De la même façon, ils ont montré que Mart-1 facilite l'expression de Silver et elle est indispensable à sa stabilité, son adressage et sa maturation. Par conséquent, des cellules mélanocytaires n'exprimant pas Mart-1, sont dépourvues de mélanosomes au stade II, dotés de structures fibrillaires. Mart-1 serait indispensable à la structure fibrillaire du mélanosome au stade II au même titre que Pmel17.



Figure 11 : en haut la souris C57BL6J WT non agouti. En bas la souris C57BL6J non agouti *si/si* (Silver, 1995)

## I.4.6 Les mutations

### I.4.6.1 La souris (*Mus Musculus*)

La souris « *silver* » décrite pour la première fois par Hagedoorn, est apparue dans sa colonie de souris noires. A la naissance, elle possède des poils noirs ; mais suite à la deuxième poussée de poils, il apparaît des poils blancs qui interceptent les poils noirs (Hagedoorn, 1912). Ce caractère a été observé par un éleveur anglais 18 ans plus tard (Dunn et *al.*, 1930). Hagedoorn a perdu la trace de ce phénotype, et il était impossible de déterminer l'identité avec celui observé par Dunn. Ce phénotype a été connu des éleveurs anglais sous les deux appellations « silver gris » et « silver brun ». Les souris « silver gris » semblent être noires et présentent un patron mélangé de poils à pointes blanches, de poils entièrement blancs, et de poils noirs (Figure 11). Par ailleurs, les souris « silver brun » sont de couleurs plus claires que le chocolat standard avec des poils aux pointes blanches ou

parfois entièrement blancs. Pourtant elles n'ont jamais atteint le niveau argenté des souris « silver gris ».

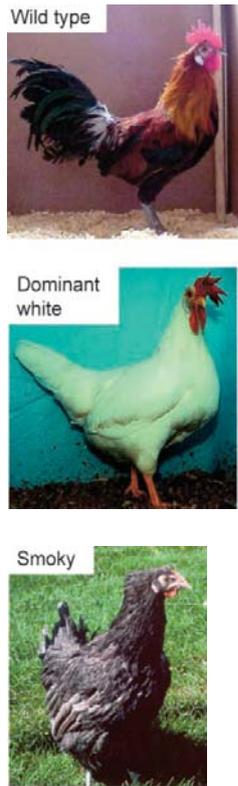
L'analyse moléculaire du gène *Silver* de la souris a mis en évidence une substitution au niveau de l'exon 11. Cette dernière entraîne l'apparition d'un codon « stop » précoce et une délétion des 25 derniers acides aminés en C-terminal de Silver (Martinez-Esparza et al., 1999). Ces derniers acides aminés correspondent au domaine cytosolique et contiennent un motif ExxPLL, d'adressage aux mélanosomes, *via* la protéine adaptatrice Ap3 (Bennett et al., 2003). Un fractionnement subcellulaire par gradient de sucrose, révèle une localisation majeure de la protéine Silver murine WT, dans des fractions mélanosomiques et prémélanosomiques de cellules Melan-a. La protéine Silver n'est pas détectée dans la fraction microsomique soluble. En revanche, la protéine Silver « *si* », tronquée en C-terminal, est préférentiellement présente dans la fraction soluble sous des formes d'agrégats et des résidus issus de produits de dégradation. Le domaine C-terminal semble donc jouer un rôle dans l'adressage de la protéine vers les mélanosomes (Solano et al., 2000). Ces derniers résultats ont été validés par Western blot et marquage en immunofluorescence (Theos et al., 2006). Dans des cellules Melan-a-*si*, il a été observé une diminution de la quantité de la forme mature de protéine Silver « *si* » dans des mélanosomes de stade II (5 fois inférieure), relativement à la forme mature de Silver WT des cellules Melan-a. Bien que les melan-a-*si* soient hautement pigmentées relativement aux melan-a, l'analyse par microscopie électronique montre que les cellules melan-a-*si* possèdent des mélanosomes aberrants, géants, avec une morphologie ronde. Ces mélanosomes sont dépourvus de marquage pour Silver « *si* » et présentent une densité électronique uniforme relativement à la forme striée des mélanosomes de cellules melan-a. De plus, peu de mélanosomes en stade II et III sont observés dans ces cellules mutantes (Theos et al., 2006).

Outre son rôle dans la formation de la matrice fibrillaire indispensable au dépôt des mélanines dans les mélanosomes, d'autres équipes ont souligné, le rôle de *Silver* dans la prolifération *in vitro* et la survie des mélanocytes chez des souris de génotype *si/si* (Quevedo et al., 1981 ; Spanakis et al., 1992). En effet, des coupes histologiques de peau montrent une sénescence précoce des mélanocytes autour du follicule pileux et une diminution rapide de leur nombre avec l'âge. Enfin des cellules mélanocytaires mutantes *si/si* en culture, ont un temps de génération 4 à 5 fois plus élevé que des cellules sauvages *Si/Si*.

#### I.4.6.2 L'homme (*Homo sapiens*)

Malgré le fait que la protéine Silver humaine ait été la plus étudiée, jusqu'à présent, aucune mutation n'a été décrite chez l'homme. Par ailleurs, des travaux de mutagenèse dirigée, sur la protéine Silver humaine ont été réalisés par Hoashi et *al.* en juillet 2006 et contredisent les données de Solano et *al.*, décrites dans le paragraphe précédent. En effet, l'équipe de Hoashi, a montré par western blot et double immunofluorescence que la délétion du domaine C-terminal  $\Delta$ CTD n'affectent ni la maturation, ni l'adressage de la protéine transitoirement exprimée dans des cellules HeLa (cellules épithéliales issus de cancer du col de l'utérus). Il en est de même pour la mutation LL662AA en C-terminal (Hoashi et *al.*, 2006).

En août 2006, Theos et *al.*, ont créé la mutation observée chez la souris « *silver* », dans des cellules humaines. Ils ont observé par microscopie électronique la localisation de la protéine Silver WT, dans les vésicules intraluminales des endosomes tardifs multivésiculaires et dans des structures fibrillaires formées dans ces derniers. En revanche, la protéine mutée « *si* » a été observée majoritairement dans le RE, la membrane plasmique et en faible fraction dans les endosomes multivésiculaires. Theos et *al.*, expliquent ces observations par une incapacité de la protéine mutée à quitter, dans un premier temps le RE, et dans un deuxième temps la membrane plasmique. Ces données sont cohérentes avec les résultats obtenus sur la protéine murine de Solano et *al.*, et vont à l'encontre des résultats obtenus par Hoashi et *al.* et remettent en cause le système d'expression (Hela) moins approprié pour l'étude de protéines spécifiques aux mélanocytes (Solano et *al.*, 2000 ; Theos et *al.*, 2006 ; Hoashi et *al.*, 2006).



**Figure 12 : des individus exprimant les phénotypes, sauvage (Wild type), Dominant white et Smoky (Kerje et *al.*, 2004)**

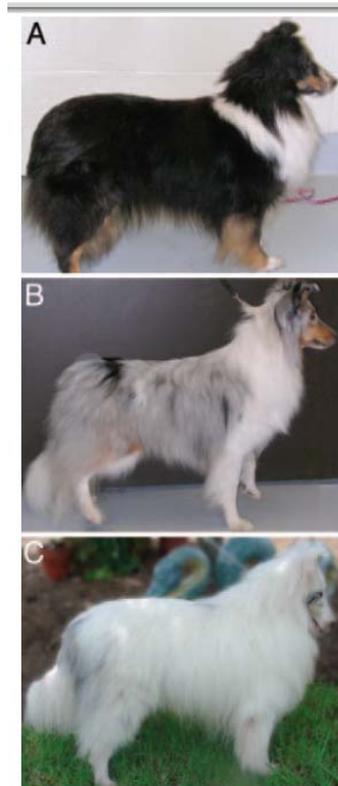
### **I.4.6.3 Le poulet (*Gallus gallus*)**

*Gallus gallus* correspond à l'espèce pour laquelle on a identifié le plus grand nombre de mutations du gène *Silver* (Kerje et *al.*, 2004).

Dominant White **I** (Blanc dominant) : le symbole **I** est relatif à l'effet inhibiteur de l'allèle sur la pigmentation. L'allèle « **I** » a une dominance incomplète sur l'allèle sauvage « **i** ». Ce phénotype est caractéristique de la race « white leghorn » et il est exclusivement associé à l'insertion de 9 pb dans l'exon 10, produisant une protéine allongée de trois résidus. Le poulet possédant cet allèle, présente un plumage blanc crémeux sans aucun motif ou marquage. Le bec et les jambes sont jaunes et les yeux bruns (Figure 12). Ce phénotype touche seulement les mélanocytes originaires de la crête neurale.

Dun **D** (Brun foncé) : révèle une dominance partielle sur l'allèle sauvage « **i** ». Les poulets hétérozygotes (**D/i**) sont Dun. Les homozygotes sont blanchâtres. Ce phénotype est associé à une délétion de cinq acides aminés dans le domaine transmembranaire de la protéine (exon 10 du gène). Cette délétion a été identifiée chez le « pit-gamecock ». Cette mutation affectant le même domaine que **I**, pourrait empêcher un ancrage approprié de Pmel17 dans la membrane du mélanosome. Par conséquent la biogenèse de ce dernier est altérée.

Smoky *S* (grisâtre) : présente une dominance partielle sur l'allèle sauvage « *i* » et une récessivité par rapport au Dominant White « *I* ». L'allèle en question contient la mutation du Dominant White, mais le caractère Smoky est associé à une délétion de 12 pb au niveau de l'exon 6 qui aboutit à un raccourcissement de la protéine de 4 résidus. Ce phénotype est assimilé à une réversion de la mutation Dominant White.



**Figure 13 : Insertion d'un SINE ségrégeant avec le phénotype merle.** A) Shetland sheepdog non merle (*m/m*) tricolore (noir, sable et blanc). B) Shetland sheepdog merle Bleu (*M/m*). C) Shetland sheepdog merle double (*M/M*) (Clark et *al.*, 2006)

#### **I.4.6.4 Le chien (*Canis lupus familiaris*)**

Le profil « Merle » observé sur la robe des chiens de compagnie est caractérisé par des patches de pigment dilués. Ce caractère est transmis d'une manière autosomique, et présente une codominance par rapport au caractère sauvage. L'analyse moléculaire de l'ADN génomique de chiens Shetland sheepdog a révélé la présence d'un SINE au niveau de la jonction intron10/exon11 du gène *Silv/Silver* (Clark et *al.*, 2006). Ce SINE est absent chez les chiens non merle (*m/m*) (Figure 13A-C), où *M* représente le caractère merle et *m* le caractère non merle. Le SINE a une taille de 253 pb de taille et possède une queue oligo (dT), présentant une taille variable selon les animaux. Par ailleurs, il n'est pas un marqueur spécifique à la race Shetland sheepdog. En effet, il est bien présent sous forme hétérozygote

chez tous les chiens « merles » testés de six autres races : Collie, Border Collie, Australian Sheperd, Cardigan Welsh Corgi, Dachshund et Great Dane. Outre le phénotype merle, la présence d'un SINE est associée à des troubles auditifs chez des chiens Dachshunds, allant jusqu'à la surdité complète (Reetz et *al.*, 1977). Tous les chiens non merle ( $m/m$ ) présentaient une audition normale. De même des études ophtalmologiques sur trois groupes de chiens Dachshunds (double merle  $M/M$ , merle  $M/m$ , et non merle  $m/m$ ), ont montré que les caractères merle et double merle présentent fréquemment des anomalies oculaires, avec une augmentation de la pression intraoculaire et de l'amétropie (Klinckmann et *al.*, 1987) ; anomalies de la réfraction de l'œil, congénitales ou acquises, caractérisées par une mauvaise mise au point des images rétiniennes venant d'objets situés à l'infini ou par un effort de mise au point. Ces données soulignent des effets pléiotropes de *Silver*.

#### **I.4.6.5 Le cheval (*Equus caballus*)**

Le phénotype « Silver » chez le cheval est caractérisé par une dilution du pigment noir des poils. Ce phénotype présente un mode de transmission autosomique dominant. Deux mutations ont été identifiées chez différentes races de chevaux (Brunberg et *al.*, 2006). La première mutation est faux-sens, et se trouve dans l'exon 11 (Arg618Cys). La deuxième se trouve dans l'intron 9. Les deux mutations sont associées au phénotype « Silver ». Cependant, seule la mutation faux-sens semble être causale. Tous les animaux de phénotype « Silver » de 14 races différentes possédaient au moins une copie de l'allèle muté (Arg618Cys). Les animaux témoins non « Silver » ne possédaient pas la mutation. Par ailleurs, la présence de cette mutation chez différentes races de chevaux, suggère une origine ancestrale commune (Brunberg et *al.*, 2006).

#### **I.4.6.6 Le poisson zèbre (*Danio rerio*)**

*fading vision (fdv)* est la première mutation affectant la coloration décrite chez le poisson (Schonthaler et *al.*, 2005). Ce mutant affecte la biogenèse du mélanosome, il en résulte une hypopigmentation des cellules mélanogéniques du RPE et de la peau, et une perte de la fonction visuelle pour les larves âgées de 5 jours. A l'âge adulte, on observe un recouvrement partiel de la vue. L'analyse ultrastructurale des coupes histologiques de ces mutants montre une aberration morphologique du RPE et des mélanocytes de la peau. Les

mélanosomes sont de forme aberrante avec une répartition interne de mélanines d'une manière inégale, montrant un déficit dans la structure intramélanosomale et non dans la synthèse de mélanines. Ce phénotype, est lié à une substitution en position 1468 pb de l'ADNc de *Silva/Silver*, générant un codon stop précoce. La protéine est tronquée au niveau de son site de clivage furin-like, elle ne possède plus son domaine transmembranaire et le motif de fixation de la protéine adaptatrice Ap3. Ces domaines ont bien été étudiés pour leur rôle important dans la fonction de la protéine (Theos et *al.*, 2006a).

#### **I.4.6.7 Le bovin (*Bos taurus*)**

Le gène *Silver* bovin est localisé sur le chromosome 5 (BTA5), et comprend 11 exons et 10 introns. Le transcrit comprend 1950 nucléotides, avec un 5'UTR de 29 nucléotides et un 3'UTR de 106 nucléotides. Il code pour une protéine de 649 aa (Oulmouden et *al.*, 2001). Les travaux de Oulmouden et *al.*, ont identifié deux mutations du gène *Silver*. La première est une substitution G64A. Elle est présente exclusivement chez la race Charolaise (Figure 6B), et son allèle est désigné par *Dc* (dilution charolais). La deuxième mutation correspond à la délétion d'un trinucéotide  $\Delta$ TCT53, identifiée chez les races Simmental (Figure 6C) et Blonde d'Aquitaine, et l'allèle est désigné par *Ds* (dilution Simmental). La dénomination de ces deux allèles fait référence à leur association avec les loci de dilution, déjà décrits chez les races Charolaise et Simmental (Renieri et *al.*, 1993). Les deux mutations affectent le peptide signal de la protéine. *Dc* résulte d'une substitution d'un résidu glycine par un arginine Gly22Arg en position -3 du site de clivage. *Ds* résulte d'une délétion du 19<sup>ème</sup> résidu leucine  $\Delta$ L19 en position -6 du site de clivage. Les études *in silico* (<http://expasy.org/>) montrent une altération de l'hydrophobicité du peptide signal et de sa longueur respectivement pour *Dc* et *Ds*. Oulmouden et *al.*, suggèrent une inhibition du clivage de ce dernier et ensuite un blocage de la protéine dans le RE. Un faux adressage de cette protéine vers les lysosomes induit une dégradation de sa fonction cellulaire. Kuhn et *al.*, ont montré une association de l'allèle *Dc* avec une dilution des eumélanosomes. Ils ont évoqué l'effet d'un autre facteur génétique modulant la dilution causée par cet allèle. Ce facteur modulateur pourrait expliquer la diversité phénotypique du gris (allant du blanc crémeux au gris clair) et du jaune/rouge indépendamment du sexe, observée dans les F2 issus de parents Charolais x German Holstein (Kuhn et *al.*, 2007). Gutierrez-gil et *al.*, ont trouvé par « Genome scan » (balayage du génome), que la région [ETH10-DIK5248] du

chromosome 5 était en liaison avec la dilution de couleur ; ils ont choisi *Silver* comme gène candidat et ont validé l'association de l'allèle *Dc* avec une dilution de coloration eumélanique et ont montré aussi une association significative de ce dernier avec une dilution phéomélanique (Gutierrez-gil et *al.*, 2007). Le mode de transmission proposé est une co-dominance. Cependant ils ont eu quelques animaux de phénotype blanc incohérent avec leurs génotypes (*Dc/dc*<sup>+</sup>) et gris et rouge pale de génotype (*Dc/Dc*) ; où *dc*<sup>+</sup> est l'allèle sauvage. Ils ont suggéré l'implication d'un autre locus *Lyst* situé dans la région liée au chromosome 28. Chez la race japonaise noire, des mutations de ce gène sont une cause d'hémorragie et les animaux ont une couleur claire. Des mutations ayant un rôle spécifique dans la pigmentation, pourront expliquer les divergences observées par Gutierrez-gil et *al.* pour certains animaux. Dans ce cas, le gène *Lyst* pourrait jouer un rôle modulateur ou supprimeur de *Silver*. Le séquençage de la région codante de *Silver* chez 16 animaux a révélé la présence de nouvelles mutations faux-sens : c.107G>T causant le changement d'une sérine en leucine, et une deuxième substitution c.1122C>A causant la modification d'un résidu alanine en acide glutamique. Aucune de ces mutations n'a montré une association avec le phénotype de dilution.

## *Chapitre II*



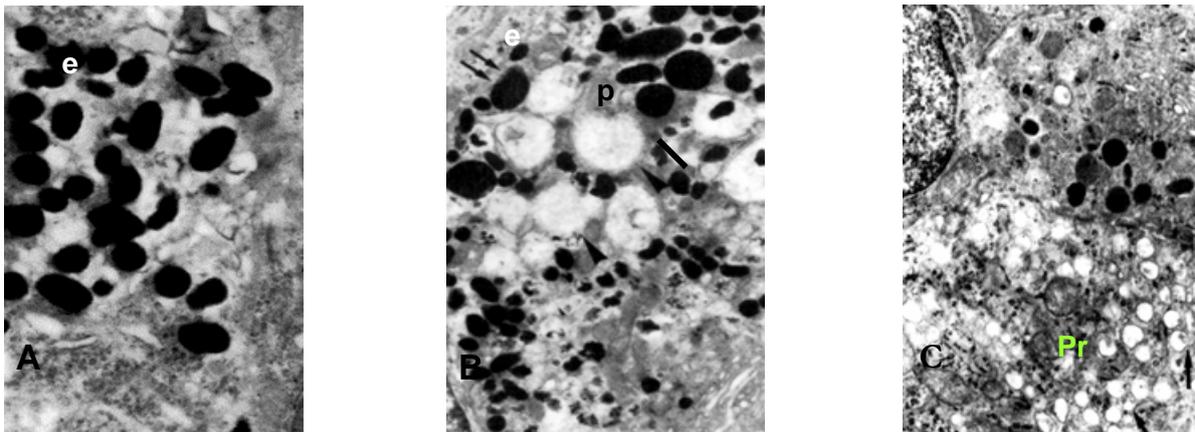
## II. Projet de thèse

### II.1 Introduction du projet

Dans le cadre des travaux de recherche de marqueurs génétiques utilisables comme outils d'authentification de l'origine raciale des bovins, notre équipe a récemment mis en évidence un marqueur génétique de la race Charolaise, le gène: *Pmel17*.

Une étude moléculaire menée par Oulmouden et *al.*, sur 12 races bovines a conduit à la découverte de deux allèles *si* (*Dc*) et *siI* (*Ds*) chez les races Charolaise et Simmental respectivement. L'allèle *si*, présent exclusivement chez la race Charolaise, se caractérise par une substitution d'un nucléotide et l'allèle *siI*, par la délétion de trois nucléotides.

Les deux mutations affectent la région codant le peptide signal de *Pmel17* et conduiraient à un blocage de l'adressage de la protéine au mélanosome. Ce dernier reste bloqué au stade prémélanosome (Figure 14). Cette hypothèse expliquerait la dilution de la couleur de la robe associée aux races Charolaise et Simmental. L'étude histologique menée par Carlo Renieri et *al.*, a montré une absence de mélanosomes matures, au sein des mélanocytes au niveau de la peau de vaches Charolaises (Renieri et *al.*, 1993). Cette étude conforte notre hypothèse ; qui attribue un rôle inhibiteur de la mutation Charolaise dans la maturation et l'adressage de la protéine.



**Figure 14 : mise en évidence de l'ultrastructure des mélanosomes au niveau de peaux bovines.**

A) Prim'holstein : présence unique d'eumélanosomes (e) majoritairement en stade IV. B) Limousine : présence d'eumélanosomes (e) et de phéomélanosomes (ph). C) Charolaise : présence unique de prémélanosomes bloqués en stade I (pr) (Renieri et *al.*, 1993)

Afin de mieux comprendre l'effet de ces mutations au niveau moléculaire, nous avons entrepris une approche fonctionnelle basée sur la création de modèles murins. Mon projet consiste à recréer les deux mutations, *si* et *si1*, observées chez le bovin en générant des souris mutées pour chacun des deux allèles murins. Ceci sera réalisé en appliquant la méthode Gene-targeting, basée sur le principe de la recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (Thomas et *al.*, 1987). Pour cela, j'ai préparé trois vecteurs de ciblage : les deux premiers visent à recréer les mutations Simmental et Charolaise dans le gène murin, et la troisième construction a pour but de générer une souris KO, afin d'étudier un effet de cette délétion.

Parallèlement à ce travail, je me suis intéressé également aux mécanismes moléculaires impliqués dans le changement de couleur de la robe chez le bovin qui caractérise la race Gasconne mais également certaines races italiennes.

## **II.2 Matériels et méthodes**

### **II.2.1 Matériels et méthodes du projet souris transgénique**

#### **II.2.1.1 Techniques de Biologie moléculaire**

##### **II.2.1.1.A Préparation d'ADN génomique**

Les queues de souris C57BL6, coupées en fragments de 0,5 cm/tube Eppendorf vide de contenance 1,5 ml et conservées à -20 °C, sont traitées avec de la protéinase K (20 U/mg) dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, ajusté à pH 8,0). L'incubation est faite sur la nuit à une température de 55 °C. Le lendemain les lysats de queues sont centrifugés 5 minutes à 16800 x g. Le surnageant visqueux est transféré dans un autre tube. Un volume équivalent de phénol est ajouté. L'extraction de l'ADN génomique en phase aqueuse se fait en renversant les tubes pendant 5 min. Une étape de centrifugation est nécessaire pour séparer les deux phases aqueuse et organique. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un autre tube. L'extraction est répétée une fois. Une extraction au mélange 24 : 1 de CHCl<sub>3</sub>/Alcool isoamylique est faite. Ensuite, l'ADN génomique est précipité à température ambiante avec de l'acétate de sodium (3 M CH<sub>3</sub>COONa, pH 5,2) ajouté au 1/10, et 2,5 fois en volume d'éthanol absolu. Si aucun précipité n'apparaît, on met à -20 °C pendant 2 heures. Le culot d'ADN est obtenu en centrifugeant à 16800 x g pendant 5 min. L'ADN est lavé des sels avec de l'éthanol 70 %. Le culot est séché à 50 °C pendant 10 min dans un speed-vacuum pour se débarrasser des résidus éthanol. L'ADN est repris dans un volume de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA à pH 8) et laissé resuspendre à température ambiante sur la nuit. Le dosage est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre sous une  $\lambda = 260$  nm. L'ADN est conservé à -20 °C.

##### **II.2.1.1.B Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

L'approche PCR a été employée pour obtenir des fragments d'ADN d'intérêt, à partir du génome murin ou pour mettre en évidence des clones recombinants. Essentiellement, deux types de Taq polymérases ont été utilisés. Dans le cas d'amplification de fragments d'ADN d'une taille comprise entre 2 et 20 kpb, la réaction de polymérisation en chaîne est réalisée avec le kit (Expand Long Template PCR System, de Roche) la long Taq selon les recommandations du fournisseur, y compris pour les

conditions d'amplification PCR en tenant compte de la température d'hybridation des amorces. Pour des amplifications d'une taille inférieures à 2 kpb, nous avons utilisé la taq Abgen selon les recommandations du fournisseur.

#### **II.2.1.1.C Purification des acides nucléiques**

L'analyse de produit de PCR se fait par électrophorèse en gel d'agarose contenant le bromide d'éthidium (0,5 µg/ml) comme intercalant de l'ADN. Le tampon utilisé pour les gels et pour la migration, est le TAE 0,5X (20 mM Tris, 40 mM Acide acétique, 1 mM EDTA à pH 8,3). La migration se fait à 4 V/cm. Le dépôt de l'ADN se fait avec un tampon de charge (0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % cyanol, 40 % glycérol). Le marqueur de taille utilisé est le *1Kb plus* de Invitrogen. L'ADN après dépôt et migration est analysé sous UV. La bande correspondant au fragment d'ADN amplifié est isolée du gel à l'aide d'une lame de scalpel. Le kit (Qiaquick gel extraction kit de Qiagen, France) est utilisé pour extraire l'ADN à partir de gel d'agarose. Le principe repose sur l'adsorption de l'ADN sur une colonne de billes en silice. Une aliquote de l'ADN purifié est déposé sur gel pour estimer la quantité à l'aide du marqueur de taille 1Kb+ (la bande 1,6 kpb = 10 ng/µl de dépôt).

#### **II.2.1.1.D Clonage de fragments PCR**

Les produits de PCR purifiés sont ligaturés dans le vecteur TopoTA (fragments jusqu'à 3 kpb) ou le vecteur Topo XL (fragments jusqu'à 15 kpb) selon les recommandations du fournisseur (invitrogen). Le produit de ligature est utilisé pour transformer la souche Top10 (invitrogen, France) d'*E.coli*. Une aliquote de 2 µl de ligature est ajoutée à 50 µl de bactéries chimiquement compétentes maintenues 25 min dans la glace. Le choc thermique est réalisé dans un bain-marie à 42 °C pendant 45 secondes. Par la suite, le tube est mis directement pour deux minutes dans la glace. On rajoute aux bactéries 150 µl de milieu SOC ( 2 % tryptone, 0,5 % extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> et 20 mM glucose). Les bactéries sont ensuite incubées à 37 °C sous agitation (250 rpm) pendant 1 heure. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu LB- agar supplémenté en antibiotique (Kanamycine 50 µg/ml ou Ampicilline 100 µg/ml) selon le marqueur de sélection porté par le vecteur. Les colonies

résistantes sont isolées et analysées par un premier criblage PCR à l'aide d'un couple d'amorces choisi à partir de l'insert cloné. Les clones positifs sont ensemencés en miniculture d'un volume LB de 3 ml/clone en présence de l'antibiotique pendant une nuit (~ 16 heures). Le lendemain, l'ADN plasmidique est préparé à partir de ces minicultures à l'aide du kit miniprep de Roche, France. Ces échantillons d'ADN plasmidiques sont analysés par cartographie, en les digérant avec des enzymes appropriées pour confirmer la présence de l'insert.

#### **II.2.1.1.E Séquençage**

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon la méthode de Sanger à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer). Les réactions de séquençage d'ADN nécessitent environ 200 à 400 ng de matrice, un mélange réactionnel commercial (Terminator Ready Mix, PRISM Ready Reaction Ampli *Taq* FS, Perkin Elmer) contenant les dNTPs, les ddNTPs, le MgCl<sub>2</sub> 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 10 µL de Formamide avant d'être dénaturé à 96 °C pendant 5 min.

**Tableau 1 : les oligonucléotides utilisés dans l'étude fonctionnelle**

(5'P)AMRO111	5'-CTG CTG GCT GTG AGG GC-3'
(5'P)BLUESCRIPTPCI1Mut	5'-CGC AGG AAA GAA TTC GTG AGC AA-3'
(5'P)Selecomp12	5'-GTC ACC ATG GAT CCA TGT CGA CCA TGT CAC-3'
(5'P)SILVERSELECT1	5'-GAC ATG GTC GAC ATG GAT CCA TGG TG-3'
M13F	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
M13R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
MEL6	5'-GGA TCG ATC CAG CTC TGG GTT TCC CCC TTC-3'
MEL10	5'-AGG CTA GCC TGG GCT ACA CTG GAC CTT GTC-3'
MEL12	5'-CCT CTG GAG GGA GAG GAG GAA GGC CTA TGC-3'
Neo-5	5'-CTG CGG GGC GGG GGG GAA CTT CCT G-3'
SIBCDNAF	5'-AAA CTA GTA TGG ATC TGG TGC TGA GAA AAT AC-3'
SIBCDNAR	5'-AAG GAT CCT CAG ACC TGC TGT CCA CTG AGG AG-3'
SIBHISCt	5'-TTG GAT CCT CAA TGG TGA TGA TGG TGA TGG ACC TGC TGT CCA CTG AGG AG-3'
SIL7	5'-AGC TAC AGG TAG GAC ACC TGA AGT GTC AAC-3'
SIL26	5'-CCC TGA AGG TCA GCA ATG ATG GGC CTA CAC-3'
SIL27	5'-GAT GGT GTT GTT GGC CCA GAT GAC CTG CCC-3'
SIL30	5'-CTC AGC TGC AGG CCT TGG ATG GAA GGA ACA-3'
SIL33	5'-CCA GGA CTA AGG TGG CAG TGT CAT CCG GCA-3'
SIL38	5'-GGC GAT GGT CAG CAC CCA GCT TGT CAT GCC-3'
SILVHIND3	5'-AAC CAG ATA AAG CTT ATT TTC TGT GTG-3'
(5'P)SILVERMut1	5'-CTG GCT GTG AGG GCC CTA GAA-3'
(5'P)SILVERMut2	5'-GTG CTG AGT GCG CTG GCT GTG-3'
SILVSPE1	5'-GTT GCA TAG ACT AGT CTT ACA TTT CT-3'
SIMCDNAES3R	5'- ATT GAT GAT GGT GTT GTT GGC CCA GAT AAC-3'
SiNeoF	5'-CTA ATT CTG AGG CTG CTT GGA GCA C-3'
SouthNeoF	5'-TCC TTC GCT TTC TGG GCT CAG-3'
SouthNeoR	5'-GAA GGC GAT AGA AGG CGA TGC-3'
South5F	5'-CTG AGC TGC CGG CTC ATA GAA G-3'
South5R	5'-CGG TGT GCT CCC AAA TCT GC-3'
South3F	5'-AGA CAG TAA AAA CGG GAA GAT TGG-3'
South3R	5'-GGT TAC CTG GAA GGA ACT CAG GTC-3'
Sth3F1	5'-CAC AAC CAC TAA CCA AAA TCC CC-3'
Sth3R1	5'-GAT ACT CAT TCT ATA TTA TGC ATT ATT C-3'

### II.2.1.1.F Digestions enzymatiques

Les enzymes de digestion utilisées sont : *PciI* (10 U/ $\mu$ l, NEB), *SpeI* (10 U/ $\mu$ l, NEB), *BlnI* (20 U/ $\mu$ l, Amersham), *NheI* (10 U/ $\mu$ l, NEB), *HindIII* (20 U/ $\mu$ l, NEB), *NotI* (50 U/ $\mu$ l, NEB), *XhoI* (20 U/ $\mu$ l, NEB), *BstBI* (20 U/ $\mu$ l, NEB) *EcoRI* (Invitrogen) *BamHI* (10 U/ $\mu$ l, Invitrogen) et *Sall* (Invitrogen). L'emploi de ces enzymes est selon les recommandations des fournisseurs correspondants.

### II.2.1.1.G Mutagenèse dirigée

Cette technique (Figure 23 et 24) est appliquée selon le kit de mutagenèse dirigée de Clontech, France. Le mixte d'hybridation est le suivant : 2  $\mu$ l de 10x buffer, 2  $\mu$ l pSi (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l d'amorce de sélection (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l d'amorce de modification (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l) et qsp H<sub>2</sub>O pour 20  $\mu$ l. Ce mixte est dénaturé pendant 3 minutes dans un bain marie à 100°C, et il est mis directement dans un mélange glace-eau (0°C) pendant 5 minutes. Une légère centrifugation est nécessaire pour rassembler tout le liquide au fond du tube. A ce mélange, 3  $\mu$ l 10x synthesis buffer, 1  $\mu$ l T4 DNA polymérase, 1  $\mu$ l T4 DNA ligase et 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O sont ajoutés pour procéder à la synthèse du brin double muté circulaire. Le total est bien mélangé au vortex. Les deux réactions d'élongation et de ligature se déroulent à 37°C pendant 2 heures. La réaction est arrêtée en chauffant à 70°C pour 5 minutes. Le tube est laissé refroidir à température ambiante. Le mixte (30  $\mu$ l) est digéré par l'enzyme de restriction *PciI* pour éliminer les formes double brin sauvage de pSi. 1,5  $\mu$ l 10x annealing buffer, 2  $\mu$ l NaCl 0,5 M et 1,5  $\mu$ l enzyme de restriction *PciI* (10 U/ $\mu$ l) sont ajoutés au mixte et la réaction de digestion est incubée à 37 °C pendant 2 heures. Une aliquote de 5  $\mu$ l a été transformée dans des bactéries BMH 71-18 *mut S* (§.II.2.1.1.D). La double sélection est faite sur des boîtes de pétri LB-amp-tet (100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml). Huit colonies ont été isolées et amplifiées pour des préparations d'ADN plasmidiques. Les ADN plasmidiques ont été digérés par *PciI* (1  $\mu$ l ADN + 1  $\mu$ l Tampon de digestion + 0,5  $\mu$ l *PciI* et 7,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) à 37°C pendant 3 heures. 5  $\mu$ l de chaque digestion ont servi pour la transformation des bactéries Top10 (§.II.2.1.1.D). La sélection est faite sur des boîtes de pétri LB-amp (100  $\mu$ g/ml).

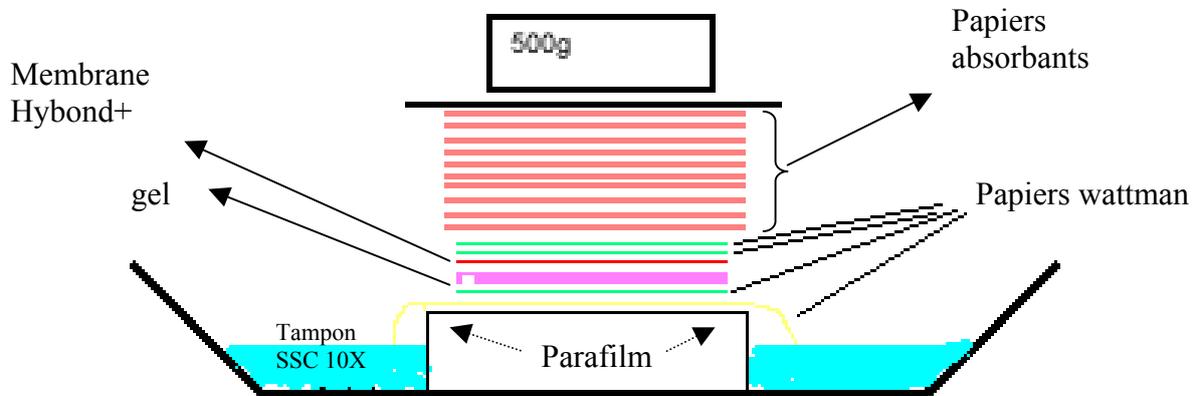
### **II.2.1.1.H Southern blot**

Cette technique est utilisée pour cribler les clones ES résistants, afin de vérifier si un double événement de recombinaison homologue a eu lieu ou pas.

*Préparation des sondes* : les sondes spécifiques des régions du gène *Silver* murin en amont du fragment de ciblage et en aval sont désignées respectivement par sonde 5' et 3'. Une troisième sonde spécifique de la cassette Neo (résistance à la Néomycine) est désignée par SouthNeo. Les sondes 5' et 3'1 froides ont été synthétisées par PCR sur de l'ADN génomique BL6, en utilisant respectivement les couples d'amorces South5F/South5R (taille : 967 pb) et South3F/South3R (taille : 994 pb). Une deuxième sonde 3'2 en 3' a été synthétisée par le couple d'amorces Sth3F1/Sth3R1 (taille : 548 pb). La sonde Neo est synthétisée par PCR sur de l'ADN plasmidique PPNT-*frt3* avec le couple d'amorces SouthNeoF/SouthNeoR. Le produit de chacune des trois PCR est cloné dans le vecteur TopoTA comme précédemment. Après migration sur gel, ces PCR sont purifiées comme auparavant par le kit (Qiaquick de Qiagen). Les nouveaux vecteurs contenant les sondes 3'1, 3'2, 5' et Neo, sont séquencés avec les amorces du vecteur M13F et M13R, pour vérifier les séquences des sondes clonées. Les sondes 3'1, 3'2 et Neo sont libérées de leur vecteur par digestion enzymatique avec *EcoRI* qui reconnaît deux sites du vecteur, flanquants la région des sondes. En revanche la sonde 5' est libérée par une double digestion *SpeI/XhoI* (Ces deux sites flanquent la séquence de la sonde 5'). Les sondes sont purifiées (Qiaquick de Qiagen) comme auparavant.

*Préparation des échantillons d'ADN extraits des clones résistants* : il s'agit de lyser les clones de cellule ES, d'extraire l'ADN génomique et de digérer ce dernier par une enzyme de restriction spécifique au criblage. Les cellules en plaque de 96 puits, sont lavées deux fois au PBS1X et les 4 exemplaires de clones sont poolés dans un tube Eppendorf (1.5 ml) pour une lyse à 50°C sur la nuit. La lyse est effectuée dans un volume de 750 µl/échantillon de tampon d'extraction (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl et 1 % SDS à pH 8) contenant 10 µl de protéinase K (20 mg/ml, Roche). Le lendemain, les protéines de lysats cellulaires sont précipitées avec un volume de 250 µl NaCl 6 M (saturé) par échantillon, en retournant le tube en plan vertical pendant 5'. Les protéines sédimentent au fond du tube après centrifugation pendant 10 minutes à 16800 x g. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube contenant 500 µl d'isopropanol. Le mélange est retourné pour 1 minute. Une minute de

centrifugation à 16800 x g est suffisante pour descendre l'ADN au fond du tube. Le culot d'ADN est lavé avec 1ml d'éthanol 70%. Le culot d'ADN est récupéré après 5 minutes de centrifugation à 16800 x g. Après élimination du surnageant, l'ADN est laissé sécher 20 minutes à 37°C. Ce dernier est resuspendu avec 45 µl environ de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA à pH 8) pendant 1h à 65 °C. Les échantillons d'ADN sont digérés avec l'enzyme de restriction *BlnI* (10 U/µl, Amersham) pour un premier criblage en 5'. Le milieu réactionnel est composé de 15 µl d'ADN, 10 U *BlnI*, tampon K, 3 µl spermidine (40 mM) et qsp 30µl d'eau. La digestion est laissée sur la nuit à 37°C dans une atmosphère humide. Le lendemain, 5U de *BlnI* sont ajoutées et la digestion est prolongée pour 3 heures supplémentaires.



**Figure 15 : montage Southern**

*Préparation du blot* : les échantillons d'ADN digérés sont déposés pour une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % dans un tampon TAE1X à 1 volt/cm sur la nuit. Le gel est dénaturé en premier temps pendant 30 minutes, dans un bain contenant le tampon de transfert A (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl et qsp 2 litres H<sub>2</sub>O) avec un doux remuement. Le gel est rincé à l'eau déminéralisée. La basicité est neutralisée en baignant deux fois le gel dans un tampon de transfert B (0,5 M Tris, 5 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH ajusté à 7,4 et qsp 2 litres H<sub>2</sub>O) pendant 15 minutes. Trois papiers wattman et une membrane en nitrocellulose Hybond+ (Amersham) sont coupés à la taille du gel. Un quatrième papier wattman servant de pont est coupé selon la largeur du gel et suffisamment long pour tremper jusqu'au fond du tampon SSC10X. Le SSC est préparé à 20X (175,3 g NaCl, 88,2 g Tri-sodium citrate dihydrate, qsp 1 litre H<sub>2</sub>O et pH ajusté à 7). Les papiers wattman et la membrane sont mouillés dans du SSC10X avant le montage. Un passage de la pipette est nécessaire après chaque couche montée pour éliminer les bulles d'air. Le bac est rempli de tampon SSC10X. Le grand papier wattman est posé en pont mouillé à cheval. Le montage est réalisé dans cet ordre comme le montre la Figure 15. Un papier wattman, le gel face au papier wattman, les deux papiers wattman et un lot de papiers pliés suffisamment épais (10 cm) pour absorber le tampon par capillarité sur la nuit.

Le montage est fixé par une tare en dessus de 500 g sur un plateau. Le tampon absorbé va entraîner avec lui les molécules d'ADN chargées négativement qui vont se retenir par la membrane de nitrocellulose chargée positivement. La membrane est séchée entre deux papiers wattman. L'ADN est fixé par un cross-linking en exposant la membrane aux rayons UV 260 nm dans un cross-linker, conformément aux instructions du fournisseur (Amersham). Le blot est prêt et peut être conservé longtemps dans un sachet plastique.

*Marquage radioactif des sondes au  $\alpha$ dCTP<sup>32</sup>* : le kit de marquage utilisé est le « Rediprime II Random Prime Labelling System » (Amersham). Il s'agit d'une étape de dénaturation irréversible suivie de l'hybridation d'une combinaison d'hexamères. La néosynthèse de la sonde marquée est complétée par une polymérisation effectuée par une ADN polymérase tout en incorporant le  $\alpha$ dCTP<sup>32</sup> dans la sonde néosynthétisée. Ainsi, les bouts discontinus d'une sonde sont ligaturés par une T4DNA ligase. L'ADN sonde utilisé à 25 ng par essai, est dilué dans un volume final de 47  $\mu$ l tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA à pH 8). Il est dénaturé dans un bain marie bouillant pendant 5 minutes. Toute de suite, le tube est mis à refroidir dans un mélange eau-glace pendant 5 minutes. Une légère centrifugation est nécessaire pour ramener tout le contenu au fond du tube. Le tampon d'hybridation « Rapid-hyb buffer » (Amersham) est chauffé à l'avance dans un four à 65 °C. Le volume de tampon utilisé est de l'ordre de 0,100 ml/cm<sup>2</sup>. L'ADN dénaturé est transvasé dans le tube de réaction contenant le mixte de marquage sous forme de culot bleu, sans l' $\alpha$ dCTP<sup>32</sup>. Un volume de 3  $\mu$ l de  $\alpha$ dCTP<sup>32</sup> à 10 mCi/ml (réf : AA005-250 de Amersham) est ajouté au mixte réactionnel et le mélange est homogénéisé en aspirant et refoulant avec une pipette, jusqu'à la dissolution complète du culot bleu. Le mixte réactionnel complet est incubé 20 minutes à 37 °C. La réaction de marquage est arrêtée par l'ajout de 5  $\mu$ l d'EDTA à 0,2 M. La sonde marquée est dénaturée dans une plaque chauffante entre 95 °C et 100 °C pendant 5 minutes. Tout de suite, le tube est mis sur un mélange eau-glace pendant 5 minutes.

*Hybridation des sondes* : le blot est enroulé dans un tube en verre dédié à la manipulation en radioactivité, de manière à ce que la face d'acides nucléiques soit orientée vers la lumière du tube et sans qu'il y ait chevauchement. Il est mouillé avec de l'eau. L'excès d'eau est jeté. Le volume de tampon d'hybridation préchauffé à 65 °C est ajouté. La membrane est laissée préhybrider dans le four en rotation pendant 30 minutes. La sonde marquée est diluée dans

600 µl de tampon d'hybridation avant d'être transvasée dans le tube d'hybridation contenant la membrane. L'hybridation est effectuée à 65 °C sur la nuit.

*Lavage* : le but de cette étape est de se débarrasser des hybridations aspécifiques afin de réduire le bruit de fond. Trois niveaux de stringence sont appliqués en ordre:

Bas (SSC 2X, 0,1 % (w/v) SDS): un rinçage bref et deux autres à 42 °C pendant 5 minutes.

Moyen (SSC 1X, 0,1 % (w/v) SDS) : deux rinçages à 42 °C pendant 10 minutes.

Haut (SSC 0.1X, 0,1 % (w/v) SDS) : quatre rinçages à 63 °C pendant 5 minutes.

Le nombre de lavages au niveau haut, ainsi que la température, peuvent être modifiés en fonction du blot.

*Révélation* : le blot est mis dans une cassette à écran qui permet l'amplification du signal. Les rayons émis de l'élément P<sup>32</sup> vont impressionner un film autoradiographique exposé entre 3 heures et 24 heures à -80 °C selon l'intensité. Après exposition, le film est révélé dans l'appareil *Hyperprocessor* (Amersham).

## **II.2.1.2 Techniques de Biologie cellulaire**

### **II.2.1.2.A Préparation des fibroblastes primaires de souris**

Les fibroblastes conservées dans l'azote liquide, sont préparées comme suit :

Un tube cryoconservé, contenant  $5 \cdot 10^6$  cellules, est incubé à 37 °C pendant 20 secondes. A l'aide d'un pipetman, 1 ml de milieu de culture est ajouté au tube et une série d'aspiration et de refoulement est nécessaire pour accélérer la fusion et diluer le DMSO. Les cellules décongelées sont transvasées dans un tube Falcon contenant 4 ml de milieu de culture.

Milieu de culture pour fibroblastes primaires :

Composés	Volume
D-MEM + 4,5 g/ml Glucose + L-Gln + pyruvate (Gibco Réf 41966-029)	89 ml
Sérum veau fœtal décomplémenté par la chaleur (Sigma réf : F7524, lot :53K3396 )	10 ml
Acides aminés non essentiels 100x (Gibco)	1 ml

Les cellules sont centrifugées à 270 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris avec 2 ml de milieu de culture et complété à 20 ml. Les cellules sont réparties de manière égale dans 5 boîtes de pétri 15 (Nunc). Des mouvements de va-et-vient sont nécessaires pour un ensemencement homogène des cellules en boîtes. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37 °C et à 5 % en CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé le lendemain, afin de d'éliminer les débris de cellules mortes. Les cellules sont maintenues trois jours en culture. Les boîtes de cultures à 80 % de confluences (en phase exponentielle de croissance) sont traitées à la mitomycine C. Le milieu des boîtes de culture est remplacé par du milieu neuf avec de la mitomycine C à un taux de 1.10<sup>-2</sup> mg/ml. Le traitement mitomycine C se fait à l'étuve 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> pendant 2 heures et demie. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois avec 10 ml de PBS 1X, sans Ca<sup>2+</sup>, ni Mg<sup>2+</sup> (Invitrogen). 2 ml de trypsine/EDTA 0,05 %/0,5 mM (Invitrogen) sont ajoutés par boîte de 10 et les cellules sont incubées 5 minutes à 37 °C. La dissociation des cellules est accélérée par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette. La trypsination est arrêtée avec un volume équivalent de milieu sérum. Les cellules sont centrifugées à 270 g (1200 rpm) pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans 5 ml de milieu sérum. Les cellules sont comptées sur une lame de Malassez sous microscope. La concentration des cellules est rendue à 2.10<sup>5</sup> cellules/ml. L'ensemencement sur de boîtes de 10 se fait de l'ordre de 1.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, les cellules nourricières sont prêtes pour l'ensemencement des cellules souches embryonnaires. Ces fibroblastes peuvent être utilisées pendant 4 jours.

### II.2.1.2.B Culture des cellules souches embryonnaires Bruce4

Les cellules souches embryonnaires Bruce4, conservées dans l'azote liquide, sont régénérées de la même manière que pour les fibroblastes. En revanche, le milieu utilisé est :

Composés	Volume
D-MEM + 4,5 g/ml Glucose + L-Gln + pyruvate (Gibco, réf. 41966-029)	100 ml
Sérum de veau fœtal décomplémenté par la chaleur (Gibco, réf. : 1240016)	15 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol (14 %)	200 $\mu$ l
LIF ( $10^6$ U/ml)	12 $\mu$ l
L-Glutamine	1 ml

A savoir que le milieu utilisé pour laver les cellules ne contient pas de LIF. Les cellules ES sont resuspendues dans du milieu (+LIF) etensemencées sur les boîtes de fibroblastes primaires préparées la veille.

### II.2.1.2.C Electroporation des cellules ES Bruce4 provenant de souris C57BL6J

L'électroporation requiert une préparation au moins 24 heures à l'avance de cellules ES sur boîtes en gélatine 0,1 %. Après trois jours de culture sur des fibroblastes primaires, les cellules ES ont atteint un nombre suffisant pour procéder à l'électroporation. Les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X. Elles sont trypsinées comme auparavant avec 2 ml de volume trypsine/EDTA par boîte de 10. Plusieurs aspirations et refoulements en pipette sont nécessaires pour dissocier les cellules afin de les isoler. L'action de la trypsine est inhibée par l'ajout de 6 ml de milieu par boîte. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 270 g (1200 rpm) pendant 5 minutes. Le culot, resuspendu avec 3 ml de milieu (+LIF), estensemencé au 1/3 dans deux boîtes de 10 recouvertes avec 0,1 % de gélatine. Le volume est complété à 10 ml avec du milieu (+LIF). Après 30 heures de cultures, le milieu est changé. Six heures après

le changement de milieu, les cellules sont lavées 2 fois au PBS1X, trypsinées et centrifugées comme précédemment. Le surnageant est jeté en gardant un petit volume de culture (~ 100 µl). Les cellules sont resuspendues doucement avec 500 µl de PBS1X à l'aide d'une pipette 5 ml, et elles sont posées sur glace après avoir pris une aliquote pour comptage en lame de Malassez. Le calcul est fait pour préparer un volume ( $V = 390 \mu\text{l}$ ) contenant  $7.10^6$  cellules nécessaires à l'électroporation. L'ADN « vecteur de ciblage » linéarisé (Volume final 80 µl) est déposé sur un point en haut du tube. Il est descendu doucement avec 330 µl de PBS1X. Le volume final (800 µl) ne devant pas dépasser les 800 µl est homogénéisé à l'aide d'une pipette de 5 ml. Le mélange est transvasé dans une cuve à électroporation stérile. L'électroporateur « Bio-rad gene pulser » est paramétré à l'avance (0,24 kV, 500 µF). Les cellules subissent un pulse dont le temps (longueur d'impulsion = 9,0 mS) est inférieur à 10 mS. Après ce choc électrique, elles sont laissées au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite transvasées dans un Falcon 15 ml contenant 3,2 ml de milieu (+LIF) pour être réparties dans deux boîtes pétri de 10 de fibroblastes primaire mitomycinéés résistantes à la Néomycine. Les boîtes sont complétées avec le volume nécessaire de milieu (+LIF) et homogénéisées pour être mis à l'incubateur. Le lendemain, si les clones sont bien développés, la double sélection à la Néomycine (500 µg/ml) et au Gancyclovir (2 µM) peut commencer et elle est maintenue entre 8 à 10 jours. Le milieu sélectif a été changé tous les jours à une heure près, afin de maintenir une sélection homogène et continue. La sélection est terminée et les colonies résistantes sont bien développées. Le milieu est remplacé par du PBS1X, et les colonies sont repiquées par une pipette P10 dans une plaque à 96 puits. A chaque puit, 30 µl de trypsine sont ajoutés, et la plaque est incubée 7 minutes à 37 °C. Après dissociation des cellules par action mécanique avec une pipette, elles sont transférées sur une plaque en puitsensemencée de fibroblastes primaires et contenant du milieu frais. Deux jours après, la plaque est tripliquée. Deux jours plus tard, les colonies sont traitées individuellement afin de les synchroniser. Cinq exemplaires de chaque clone ont été préparés, le premier sert de stock, et les quatre autres servent pour l'analyse en Southern blot.

## II.2.2 Matériels et méthodes : Etude *in vitro*

### II.2.2.1 Techniques de Biologie moléculaire

#### II.2.2.1.A Constructions géniques

Le but est de cloner l'ADNc de *Silver* bovin des races Charolaises et Salers et de réaliser à la fois deux fusions traductionnelles : la première avec une 6xHis tag en C-terminal de la protéine ; la deuxième est un Met-FLAG en N-terminal de la protéine. La protéine résultante est doublement taguée. L'ADNc Salers étant pris comme témoin. L'expression des séquences recombinantes est dirigée par le promoteur CMV du vecteur d'expression eucaryote pFLAG-CMV-2 (Sigma aldrich). Ces constructions géniques sont réalisées en trois étapes :

*Clonage SIBCDNAF/R dans TopoTA* : une PCR vise la région codante de l'ADNc de *Silver* a été effectuée à l'aide du couple d'amorces SIBCDNAF/SIBCDNAR comme auparavant (Expand Long Template PCR System, de Roche). L'amplifiat est cloné dans un vecteur TopoTA (invitrogen). Les clones blancs ( $\beta$ gal<sup>-</sup>) résistants à la Kanamycine ont été criblés par PCR (kit ABgene) à l'aide du couple d'amorces SIBCDNAF/SIL27. Les clones positifs sont préparés en miniprep et les échantillons ADN sont séquencés individuellement par chacune des amorces M13F, M13R, SIL7, SIL26, SIL30 et SIL38. Le clone positif SIBCDNAF/R-Topo validé par séquençage sert de matrice pour une deuxième PCR.

*Clonage SIBCDNAF/SIBHISCt dans TopoTA* : une première étape de PCR vise à rajouter une queue 6xHis en C-ter apportée par l'amorce SIBHISCt. Ainsi, la PCR est réalisée avec le couple d'amorces SIBCDNAF/SIBHISCt sur le plasmide SIBCDNAF/R-Topo ( $2 \times 10^2$  ng) comme précédemment. L'amplifiat est cloné de nouveau dans le TopoTA (invitrogen). Les clones blancs ( $\beta$ gal<sup>-</sup>) résistants à la Kanamycine ont été criblés par PCR (kit ABgene) à l'aide du couple d'amorces SIBCDNAF/SIL27. Ceux positifs désignés par SIBCDNAF/SIBHISCt-Topo ont été identifiés par PCR et validés par séquençage comme ci-dessus.

*Clonage SIBCDNAF/SIBHISCt dans pFLAG-CMV-2* : le vecteur SIBCDNAF/SIBHISCt est digéré comme auparavant avec les enzymes *SalI/BamHI*. L'insert est purifié après migration

sur gel d'agarose (qiaquick, qiagen). Le vecteur pFLAG-CMV-2 (Sigma aldrich) est digéré par le couple *XbaI/BamHI*. L'insert est cloné dans le vecteur d'expression pFLAG-CMV-2. Les clones résistants sont criblés par PCR avec le couple d'amorces SIL7/SIL33. Les clones positifs VSiWT (ADNc Salers) et VSiCH (ADNc Charolais) sont validés par séquençage.

### II.2.2.1.B Western Blot

*Extraction protéique* : les cellules transfectées sont lavées deux fois au PBS1X et les boîtes sont posées sur la glace. Un volume de 750 µl d'EDTA/PBS1X 10 mM est ajouté et les cellules sont grattées à l'aide du haut d'une pointe de 1000 µl. Les cellules sont transvasées dans un tube Eppendorf (1,5 ml), pesé au préalable. La boîte de culture est rincée une deuxième fois avec 750 µl d'EDTA pour récupérer un maximum de cellules. Les cellules sont centrifugées 4 minutes à une vitesse de 1000 x g, suffisante pour récupérer un culot. Le surnageant est enlevé et les cellules humides sont pesées. Le poids de cellules détermine le volume de tampon de lyse M-PER (PIERCE) nécessaire à l'extraction. Il faut un volume de 100 µl de tampon M-PER pour lyser 10 mg de cellules. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases est utilisé (Complete, Roche). Le culot est resuspendu à l'aide d'une pipette. Le mixte de lyse est secoué pendant 1 heure sur une roue à une température de 4 °C. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à ~ 14000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Les protéines totales sont mesurées par la méthode de Bradford (Bio-rad).

*Minigel de 10% polyacrylamide en Tris-Glycine :*

Resolving		Stacking	
Volume total	10 ml	Volume total	4 ml
H <sub>2</sub> O	4,85	H <sub>2</sub> O	2,94
40 % Acrylamide	2,50	40 % Acrylamide	0,50
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,50	1,5 M Tris (pH 8,8)	0,50
20 % SDS	0,05	20 % SDS	0,020
10 % Persulfate d'ammonium	0,10	10 % Persulfate d'ammonium	0,040
TEMED	0,008	TEMED	0,004

*Les tampons utilisés :*

*Tampon de migration 5X :*

Tris            124 mM  
Glycine        1 M  
SDS            0,5 %  
Conserver à température ambiante

*Tampon de charge 2X :*

Tris pH 6.8            0,125 M  
Bleu de bromophénol    0,04 %  
DTT                    200 mM  
Glycérol                20 %  
SDS                    4 %  
Aliquotes à -20 °C

*Tampon de transfert :*

Glycine    39 mM  
Tris        48 mM  
SDS        0,0375 %  
Méthanol 20 % en volume

*Tampon TBS :*

Tris    50 mM  
NaCl   150 mM  
Ajuster le pH à 7,5

*Tampon TBST 0,1 %*

1 litre TBS+ 1ml tween 20

*Electrophorèse :* 10 µg de protéines totales ont été déposés par puit. La migration s'effectue verticalement dans le tampon de migration et à une intensité de courant constante de l'ordre de 12 mA/gel.

*Transfert :* après avoir trempé 15 minutes la membrane en nitrocellulose (Amersham), le transfert est réalisé, verticalement (du haut vers le bas), dans un tampon de transfert en appliquant une différence de potentiel avec une intensité constante calculée conformément aux instructions du fabricant.

*Immunodétection :* les anticorps utilisés après dilutions sont (1 : 500) ANTI-FLAG M2 Monoclonal antibody-peroxidase Conjugate (A 8592, Sigma-Aldrich), (1 : 2000) Penta-His HRP conjugate (34460, Qiagen), (1 : 5000) Goat Anti-actin (sc-1615, Santa Cruz) et (1 : 2000) Anti goat (Dako). Les dilutions anticorps sont réalisées selon les instructions du

fabriquant. Tous les bains ont été faits avec agitation. L'immunodétection comprend une ou deux hybridations.

#### Hybridation primaire :

- 1- Saturation : le blot est saturé avec du TBST 1X à 0,2 % en lait, pendant 1 heure à température ambiante.
- 2- Lavage : le blot est rincé deux fois rapidement au TBST 1X et lavé une fois au TBST 1X 0,2 % lait pendant 5 minutes à température ambiante.
- 3- Hybridation primaire : L'anticorps primaire est dilué dans un volume nécessaire de TBST 1X, 0,2 % lait, respectant les dilutions ci-dessus. La membrane est mise en agitation en contact avec l'anticorps, pendant 1 heure à température ambiante ou sur la nuit à 4 °C.
- 4- Lavage : la membrane est lavée quatre fois au TBST 1X, 0,2 % lait, pendant 5 minutes chacune. Si l'anticorps primaire est couplé à la HRP, la détection sera l'étape suivante. Sinon, une seconde hybridation avec un anticorps couplé à la peroxidase serait une nécessité.

#### Hybridation secondaire

- 1- Hybridation : l'anticorps dilué dans le TBST 1X, 0,2 % lait est mis en contact avec la membrane pendant 1 heure à température ambiante.
- 2- Lavage : la membrane est lavée 4 fois avec du TBST 1X pendant 10 minutes chacune.

Détection : le kit BM Chemiluminescence Blotting Substrate POD (Roche) est utilisé.

*Quantification* : les bandes ont été quantifiées sur les films autoradiographiques (Kodak) en utilisant le logiciel ImageQuant TL (Amersham).

## II.2.2.2 Techniques de Biologie cellulaire

### II.2.2.2.A Préparation des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney : Cellules embryonnaires de reins humains)

Milieu de culture :

Composés	Volume
D-MEM + 4,5 g/ml Glucose (Eurobio)	89 ml
Sérum veau fœtal décomplémenté par la chaleur (Hyclone réf : CH30160.03, lot :CNM0124)	10 ml
Acides aminés non essentiels 100x (Gibco)	1 ml
L-Glutamine (200 mM) (Sigma-aldrich)	1 ml
Pénicilline/Streptomycine ( $10^5$ U/ml : $10^5$ µg/ml) (Invitrogen)	0,5 ml

Les cellules HEK293 conservées dans l'azote liquide, sont préparées comme suit :  
Un tube cryoconservé, contenant  $3 \cdot 10^6$  cellules, est incubé à 37 °C pour 20 secondes. A l'aide d'un pipetman, 1 ml de milieu de culture est ajouté au tube et une série d'aspiration et de refoulement est nécessaire pour accélérer la fusion et diluer le DMSO. Les cellules décongelées sont transvasées dans un tube Falcon contenant 4 ml de milieu de culture. Les cellules sont centrifugées à 270 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris avec 2 ml de milieu de culture et complété à 20 ml. Les cellules sontensemencées dans une boîte de Falcon 75 cc. Des mouvements de va-et-vient sont nécessaires pour un ensemencement homogène des cellules en boîte. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37 °C et à 5 % en CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé le lendemain afin de d'éliminer les débris de cellules mortes. Les cellules sont maintenues trois jours en culture. Quand les cellules atteignent 80 % en confluence, une trypsination est nécessaire (comme précédemment).

### **II.2.2.2.B Transfection transitoire**

Les cellules HEK293 ont étéensemencées 24 h avant la transfection dans des boîtes de 10 à raison de  $2 \cdot 10^6$  cellules/boîte. Un volume de 14  $\mu$ l de transfectant JetPEI (polyplus transfection) contenu dans 500  $\mu$ l NaCl à 150 mM est mélangé avec 7  $\mu$ g d'ADN (VSiWT ou VSiCh) contenu dans 500  $\mu$ l NaCl à 150 mM, conformément aux instructions du fabricant. Ce mixte est laissé pendant 30 minutes à température ambiante. Pour chaque transfection un essai Mock (pCMV-FLAG vide) et un témoin (sans ADN) sont effectués. Le milieu des cellules est remplacé par 5 ml de milieu neuf/boîte de 10. Le mixte de transfection est ajouté aux cellules. Après 5 heures de transfection, 3 ml de milieu sont ajoutés par boîte de culture. Après 24 heures, les milieux sont soit changés soit enlevés pour regarder l'expression de la protéine Silver recombinante à différents temps de : 24 heures, 48 heures et 96 heures.

## **II.2.3 Matériels et méthodes : Etude semi-quantitative**

### **II.2.3.1 Préparation des échantillons**

Les échantillons de peau sont traités soit frais, soit après conservation à -80 °C. Les poils sont rasés et le tissu adipeux sous-cutané est retiré. L'échantillon est ensuite découpé en petits morceaux d'environ 1 mm<sup>2</sup>, 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 analysées avec un Agilent 2100 Bioanalyzer et une puce Agilent RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies). Le marqueur utilisé est le RNA 6000 Ladder (Ambion).

### **II.2.3.2 RT-PCR**

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir de 8 µg d'ARN totaux de peaux traités à la DNase, dans un volume final de 20 µg, avec le kit « High-Capacity cDNA Archive kit » contenant un mélange d'hexamères d'amorces, conformément aux instructions du fabricant (Applied Biosystems). La réaction est incubée 50 min à 42 °C et 15 min à 70 °C. Les ADNc sont stockés à -20 °C jusqu'à utilisation.

Les RT-PCR semi-quantitatives sont réalisées en utilisant le fluorochrome SYBR Green I (1X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)), un intercalant fluorescent de l'ADN. Chaque analyse est faite en triplicatas dans une plaque de 96 puits. Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil 7900HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems) dans un volume de 25 µl. Le programme d'amplification est de 10 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 15 s à 95 °C puis 1 min à 65 °C (hybridation et élongation). Pour chaque gène d'intérêt (*Tyr*, *Trp1*, *Dct*, *Agouti*, *Silver*, et *Mclr*), un couple d'oligonucléotides est choisi préférentiellement dans la région 3'UTR, proche de la queue poly-A du transcrit d'intérêt. Ces oligonucléotides sont dessinés grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer). Ces différents couples d'amorces sont validés expérimentalement. Dans un premier temps, on recherche la concentration optimale en amorces. Trois concentrations en oligonucléotides (50, 300 et 900 nM) sont donc testées afin de déterminer la concentration qui donne le signal de fluorescence optimal. Pour cela, les solutions mères à

**Tableau 2 : les oligonucléotides utilisés dans l'étude PCR semi-quantitative**

GAPDH-s	5'-GTG AAG CAG GCG TCA GAG G-3'
GAPDH-as	5'-TTG AAG TCG CAG GAG ACA ACC-3'
TfIID-s	5'-CGT GCC CGA AAT GCT GAA TA-3'
TfIID-as	5'-TTC ACT CTT GGC TCC TGT GCA -3'
AGOUTI-s	5'-TGT GCT TCC TCA CTG CCT ACA-3'
AGOUTI-as	5'-GAG TTG TTC TTC AGG TTC CTT TCA TC-3'
MC1R-s	5'-CAC ATG CAT TCG GCA GAC A-3'
MC1R-as	5'-GTT GCA CCA AGC ATC ACG TTT-3'
SILVER-s	5'-GCC CCA TTG GTG AGA GCA A-3'
SILVER-as	5'-GCA ATG GTA GTC TCT GAG GGA AGA-3'
TYR-s	5'-CCC TGC TCA TGG AAA AAG AGG-3'
TYR-as	5'-AGC GAG GTC AGG TTT TTT GC-3'
TRP1-s	5'-ACT GCT CCA GAC AAC CTG GG-3'
TRP1-as	5'-GCT ATG GTG ACA ATC TCA GAA ATG C-3'
TRP2-s	5'-TGG TTG TCC TTT TTG CAT TGC-3'
TRP2-as	5'-TCT TTT GTT GCT TAG CTG TGT CTC C-3'

100  $\mu$ M sont diluées à deux concentrations différentes : 7,5  $\mu$ M et 0,625  $\mu$ M. L'étape suivante consiste à vérifier la relation entre le nombre de cycles ( $C_t$ ) nécessaire pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil et le logarithme de la concentration en ADN matrice. Cinq dilutions successives au  $\frac{1}{4}$  de l'ADN matrice sont réalisées. Pour une efficacité de PCR à 100 %, la pente de la droite  $C_t$  en fonction de  $\log_{10}$  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  $\mu$ l d'ADN (50 ng), 12,5  $\mu$ l de Mix SYBR Green, de 1  $\mu$ l d'amorces sens et antisens à 7,5  $\mu$ M (concentration finale de 300 nM), et de 0,5  $\mu$ l d'eau RNase-free. Deux gènes endogènes *Gapdh* (de référence) et *TfIId* (de contrôle négatif) sont utilisés à chaque fois. Ces gènes dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques permettent 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 normalisé par rapport au *Gapdh*. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux situations biologiques (calibrateur et un autre échantillon) est obtenue par le calcul qui suit :

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  dans laquelle :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (échantillon) -  $\Delta Ct$  (référence calibrateur)

$$\Delta Ct = Ct \text{ (gène d'intérêt)} - Ct \text{ (gène endogène normalisateur)}$$

Un échantillon calibrateur a été choisi pour chaque étude. 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.

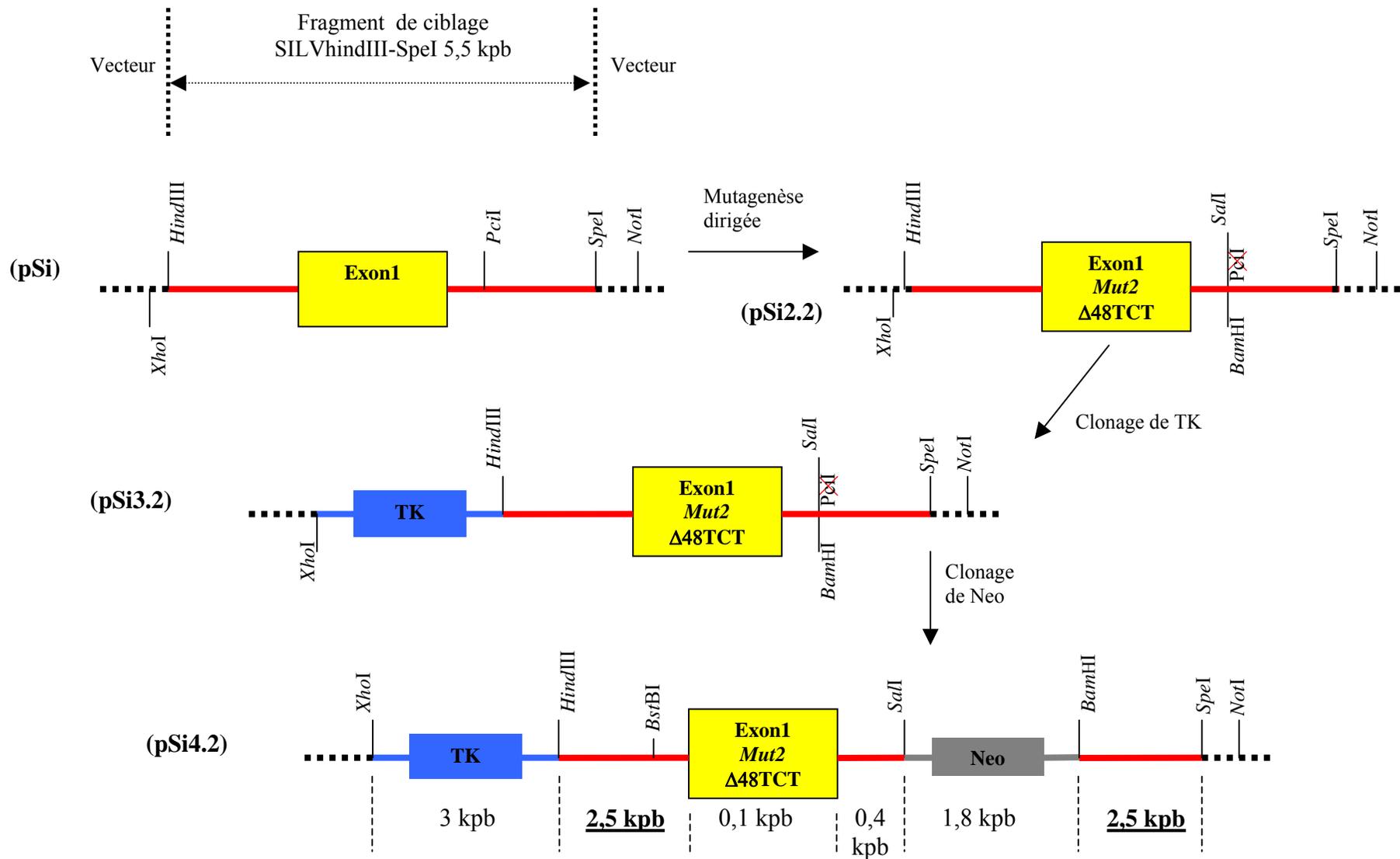
## *Chapitre III*



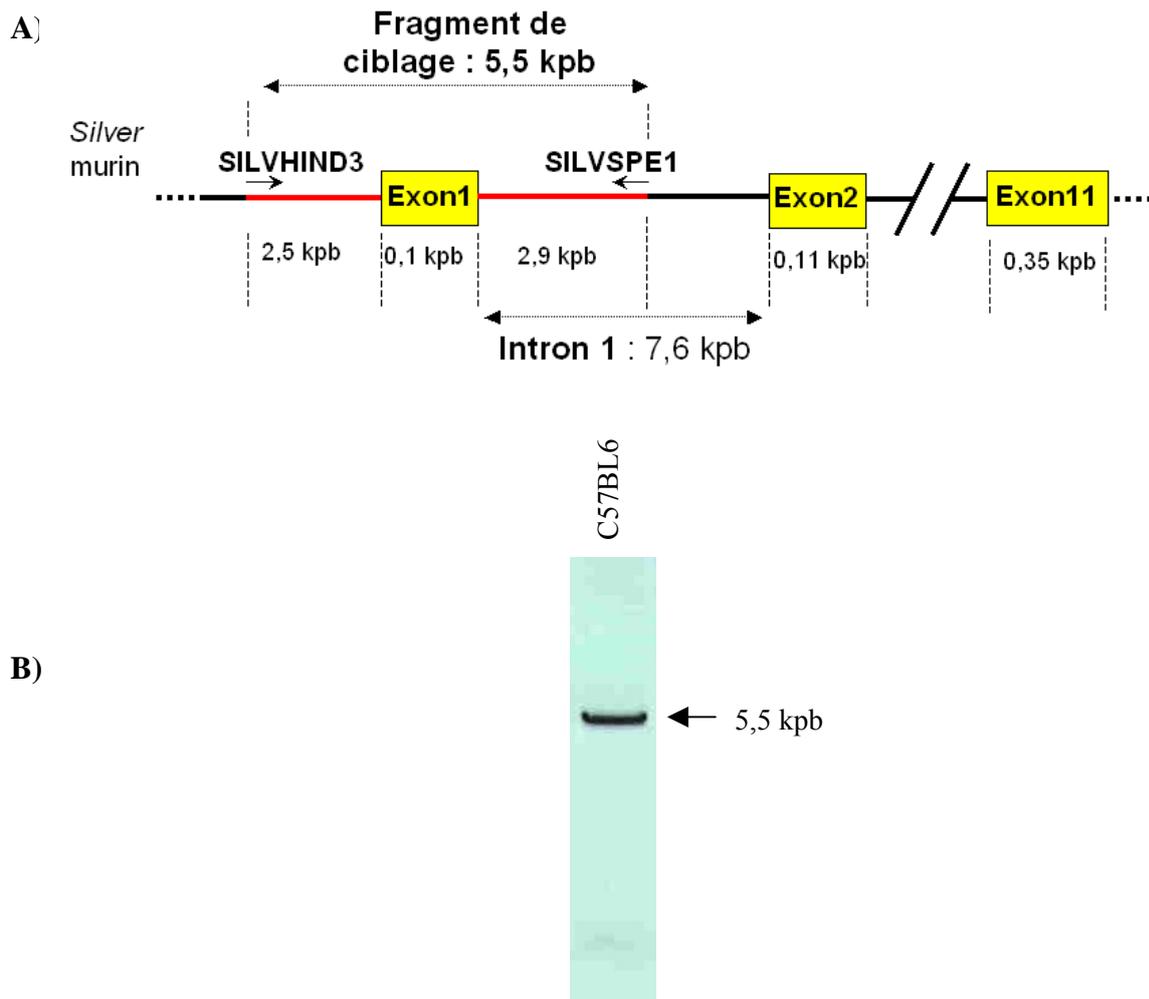
### **III. Résultats**

#### **III.1 Etude fonctionnelle des allèles *Dc* et *Ds* du gène *Silver / Pmel17* bovin par recombinaison homologue**

L'objectif de cette approche est de créer un modèle murin des deux allèles *Dc* et *Ds* du gène *Silver/Pmel17* identifiés chez le bovin. La première étape consiste en la construction des vecteurs ciblage (Figure 16).



**Figure 16 : schéma de synthèse de pSi4.2.** TK : Thymidine kinase, Neo : cassette de résistance à la Néomycine. Les bras d'homologies droit et gauche (en souligné) ont chacun une taille de 2,5 kpb.



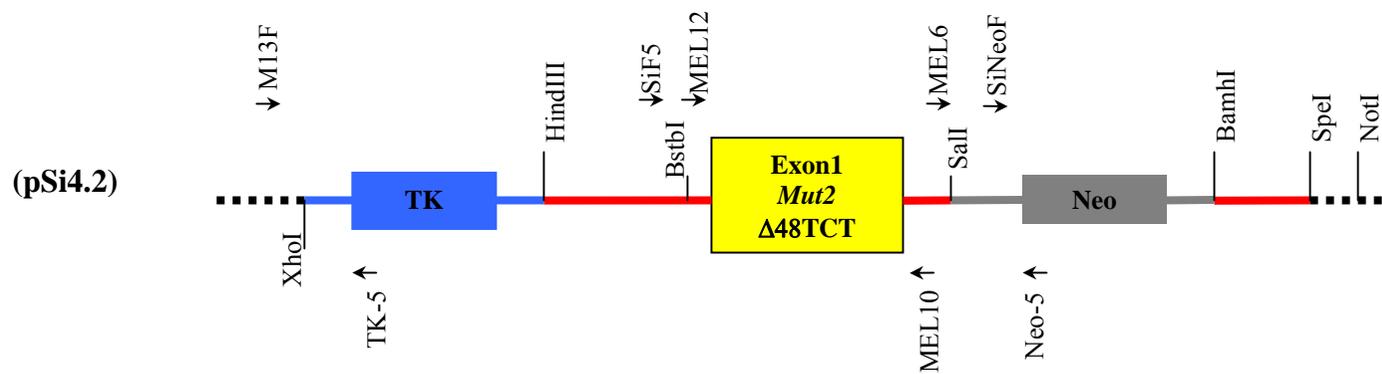
**Figure 17 :** A) région amplifiée du gène Silver murin. B) électrophorèse en gel d'agarose 0,8%, du produit d'amplification du fragment d'intérêt

### III.1.1 Obtention du fragment de ciblage

La première étape de ce travail, consiste en l'obtention d'un fragment d'ADN approprié pour une recombinaison homologe au niveau des cellules ES, en vue de la création de souris transgéniques. Nous avons choisi d'utiliser le fragment comportant l'exon1 codant du gène *Silver* murin, précisément celui de la souris C57BL6J.

Après plusieurs tentatives d'amplification, nous avons réussi à trouver un couple d'amorces qui nous a permis enfin d'amplifier un fragment (5,5 kpb) approprié pour la suite de nos travaux (Figure 17A). Le fragment amplifié présente la taille attendue (Figure 17B). Aucune amplification aspécifique n'a été obtenue. Par ailleurs, le fragment obtenu a été entièrement séquencé. Ce fragment est désigné par SILVHIND3-SPE1. Il n'y a pas eu d'amplification dans le tube témoin négatif.

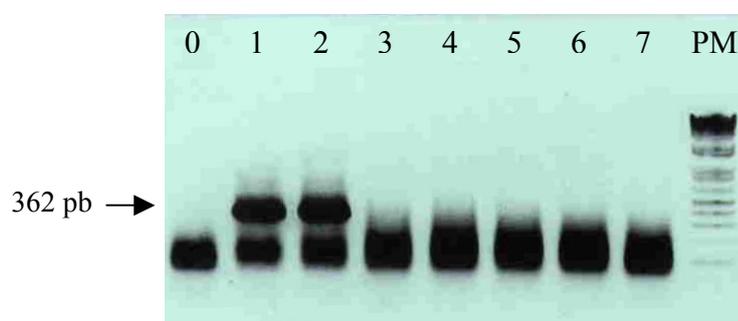




**Figure 18 : carte des amorces utilisées.** TK : Thymidine kinase, Neo : cassette de résistance à la Néomycine. Voir tableau 2 des séquences dans la partie « matériels et méthodes » (page 54).

### III.1.2 Clonage de SILVHIND3-SPE1 dans le vecteur TopoXL

Le fragment ainsi obtenu par PCR constituera l'élément à la base des mes travaux de transgénèse. Pour cela, nous l'avons cloné dans le vecteur TopoXL. Lors de ce clonage, seuls deux clones positifs contenant le fragment SILVHIND3-SPE1 ont été obtenus (Figure 19). Ces deux clones recombinants sont confirmés par cartographie avec les enzymes *EcoRI* et/ou *HindIII*. Par ailleurs, le séquençage de la partie exonique du clone 1, n'a révélé aucune mutation générée au cours de la réaction PCR.



**Figure 19** : électrophorèse en gel d'agarose de produits d'amplification obtenus par criblage PCR, avec le couple d'amorces MEL10/MEL12, de 7 clones après transformation (§.II.2.1.1.Det §.II.2.1.1.C). La piste 0 est un témoin négatif. Seuls les clones des pistes 1 et 2 s'avèrent positifs.

PM : marqueur de taille 1Kb+.

### III.1.3 Mutagenèse dirigée

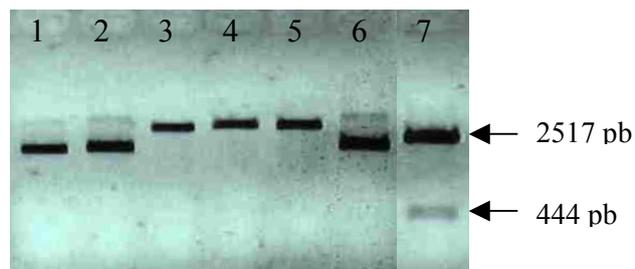
Le travail de mutagenèse proprement dit, a consisté dans un premier temps en la suppression de sites de restriction indésirables et la nécessité de créer d'autres sites de restriction nécessaires. Ainsi, plusieurs expériences préalables ont été réalisées.

Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser le pSK<sup>-</sup> comme vecteur de clonage pour toutes les manipulations de biologie moléculaire requises pour l'obtention de la construction génique appropriée.

### III.1.3.1 Préparation du vecteur pSK-Pci1<sup>mut</sup>

La première étape de cette partie consiste en la suppression du site de restriction *PciI* unique situé en dehors du multisite de clonage du vecteur pSK. En effet, la suppression de ce site est indispensable pour la suite de la mutagenèse (voir plus loin). Au lieu de détruire simplement le site *PciI*, nous avons choisi non seulement de le détruire mais par la même de le remplacer par *EcoRI* en utilisant l'amorce de modification BluescriptPciIMut. En effet, une digestion par *EcoRI* après suppression du site *PciI* constitue un contrôle positif. Dans ce cas particulier, on n'a pas besoin d'utiliser une amorce de sélection ; l'amorce de modification BluescriptPciIMut sert en même temps d'amorce de sélection négative pour la présence du site *PciI*.

Après mutagenèse, les vecteurs mutés sont criblés par digestion avec l'enzyme *PciI*. Seuls les vecteurs sauvages sont linéarisés en présence de *PciI* (Figure 20, piste 5). Le vecteur 1 n'est pas linéarisé par *PciI* (Figure 20, piste 6). Ce résultat négatif est validé par la digestion du vecteur 1 avec l'enzyme *EcoRI* libérant deux fragments de tailles respectives 444 pb et 2517 pb. Ceci confirme la création d'un deuxième site *EcoRI* à la place de *PciI*. L'autre site *EcoRI* est présent d'origine dans le multisite de clonage du vecteur (Figure 21) à 444 pb du site néosynthétisé.



**Figure 20 : électrophorèse en gel d'agarose de produits de digestion enzymatique.** 1. Le vecteur pSK-WT (wild type) non digéré - 2. Le vecteur 1 non digéré - 3. Le vecteur pSK-WT linéarisé par *BamHI* - 4. Le vecteur pSK-WT linéarisé par *EcoRI* - 5. pSK-WT linéarisé par *PciI* - 6. Le vecteur 1 digéré par *PciI* - 7. Le vecteur 1 digéré par *EcoRI* libère deux fragments de 444 et 2517 pb, témoigne de la création d'un deuxième site *EcoRI* à la place de

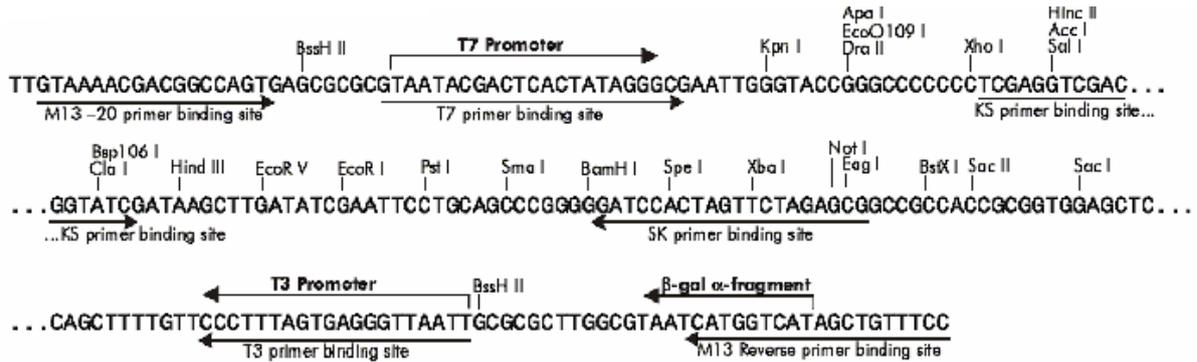


Figure 21 : carte de restriction du multisite de clonage du vecteur pSK

### III.1.3.2 Clonage de SILVHIND3-SPE1 dans le pSK-PciI<sup>mut</sup>

Le fragment SILVHIND3-SPE1 cloné dans le vecteur TopoXL (§.III.1.1) est libéré par une double digestion avec les enzymes *HindIII* et *SpeI*. Par la suite, il est cloné dans les sites *HindIII/SpeI* situés dans le multisite de clonage du vecteur pSK-PciI<sup>mut</sup>. Les clones positifs qui présentent une amplification après criblage PCR, en utilisant le couple d'amorces MEL10/MEL12 (Figure 22) sont validés par une double digestion enzymatique *HindIII/SpeI*. Cette construction obtenue est désignée par pSi.

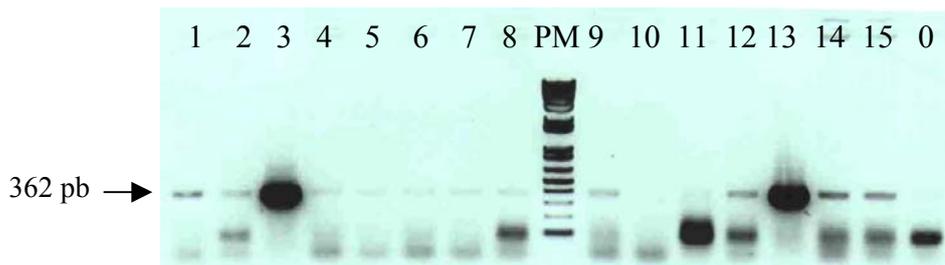


Figure 22 : électrophorèse en gel d'agarose de produits d'amplification obtenus par criblage PCR de 15 clones après transformation. Le puit 0 est un témoin négatif contenant le mixte PCR sans ADN. PM : marqueur de poids moléculaire 1Kb+.

### III.1.3.3 Préparation de pSi2.1 et pSi2.2 par mutagenèse dirigée

Cette étape a pour objectif de recréer l'équivalent des deux mutations *Ds* Simmental et *Dc* Charolaise (page 45) dans l'exon 1 du fragment *Silver* murin cloné (SILVHIND3-SPE1).

Pour cela, à partir du vecteur pSi, deux constructions sont générées portant les mutations, au niveau de l'exon 1 : la délétion (*Mut2*) et la substitution (*Mut1*). La première construction pSi2.2 (Figure 25) comprenant la délétion  $\Delta$ TCT48 (*Mut2*), est produite selon le principe du protocole de mutagenèse dirigée (§.II.2.1.1.G) en utilisant l'amorce de modification (5'P)SilverMut2 et l'amorce de sélection (5'P)SILVERSELECT1 (Figure 23 et Figure 24).

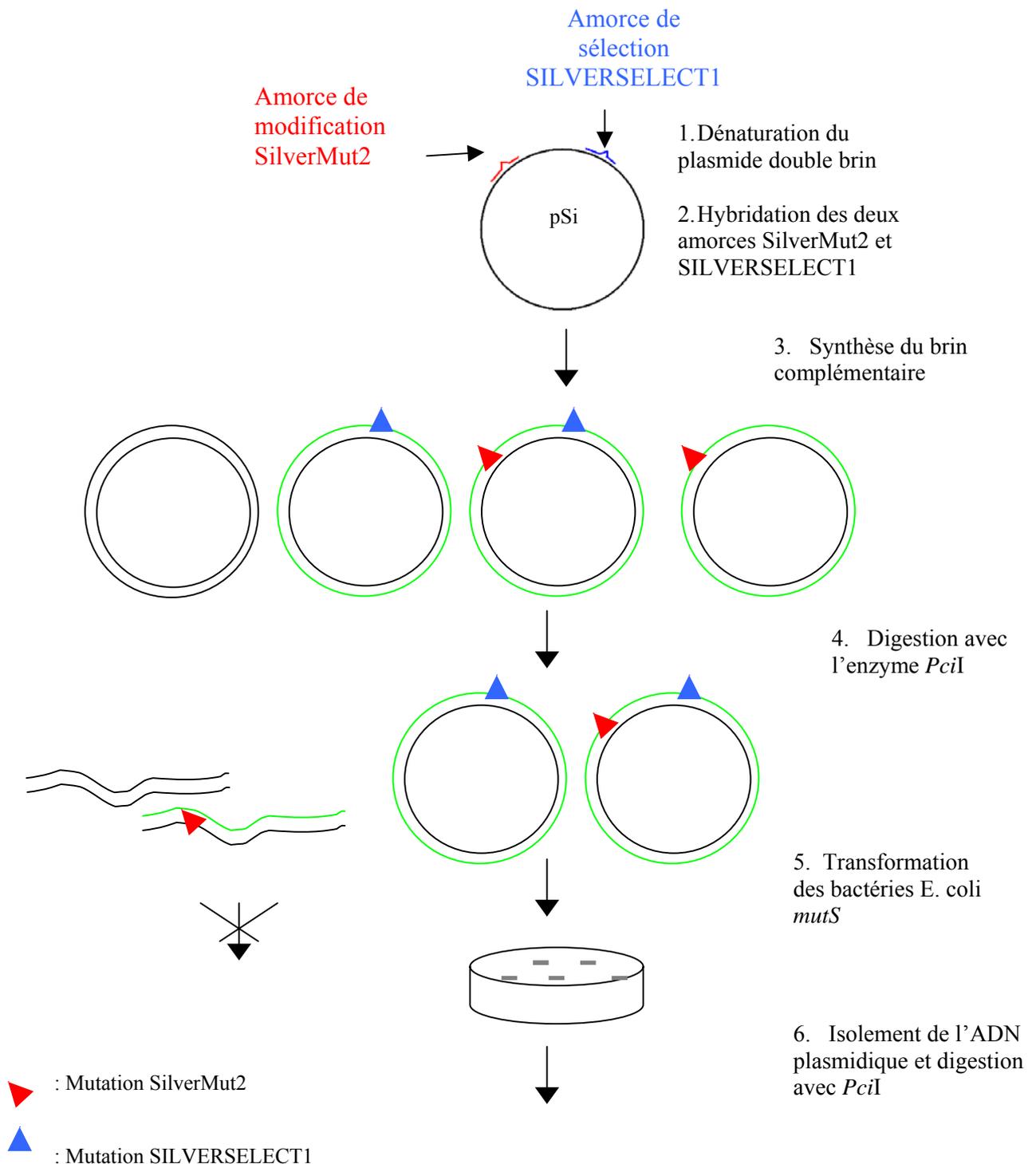


Figure 23 : Schéma de synthèse de pSi2.2 par mutagenèse

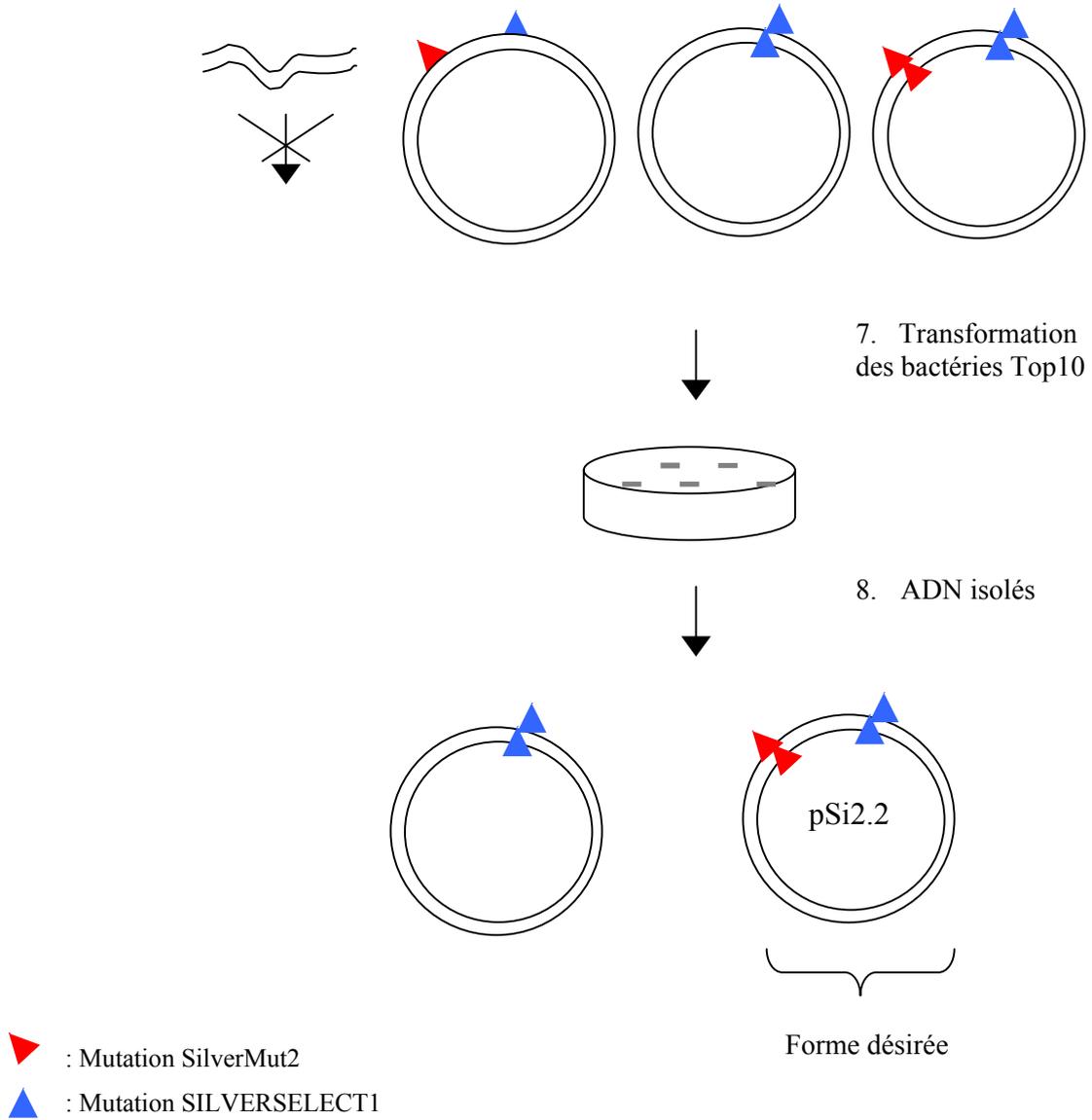


Figure 24 : suite du schéma de la synthèse de pSi2.2 par mutagenèse dirigée

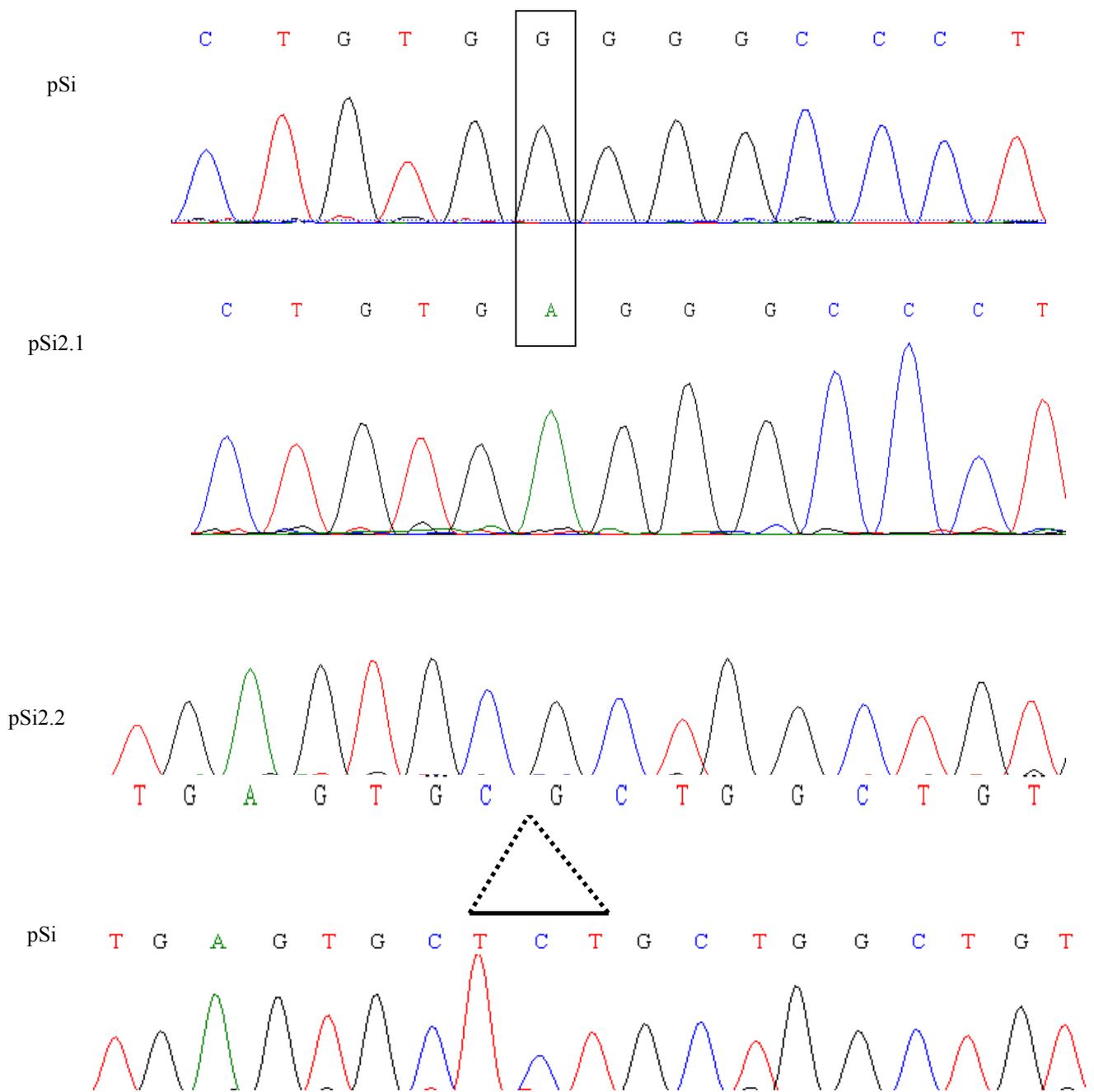


Figure 25 : séquençage de pSi2.1, pSi2.2 et pSi (sauvage)

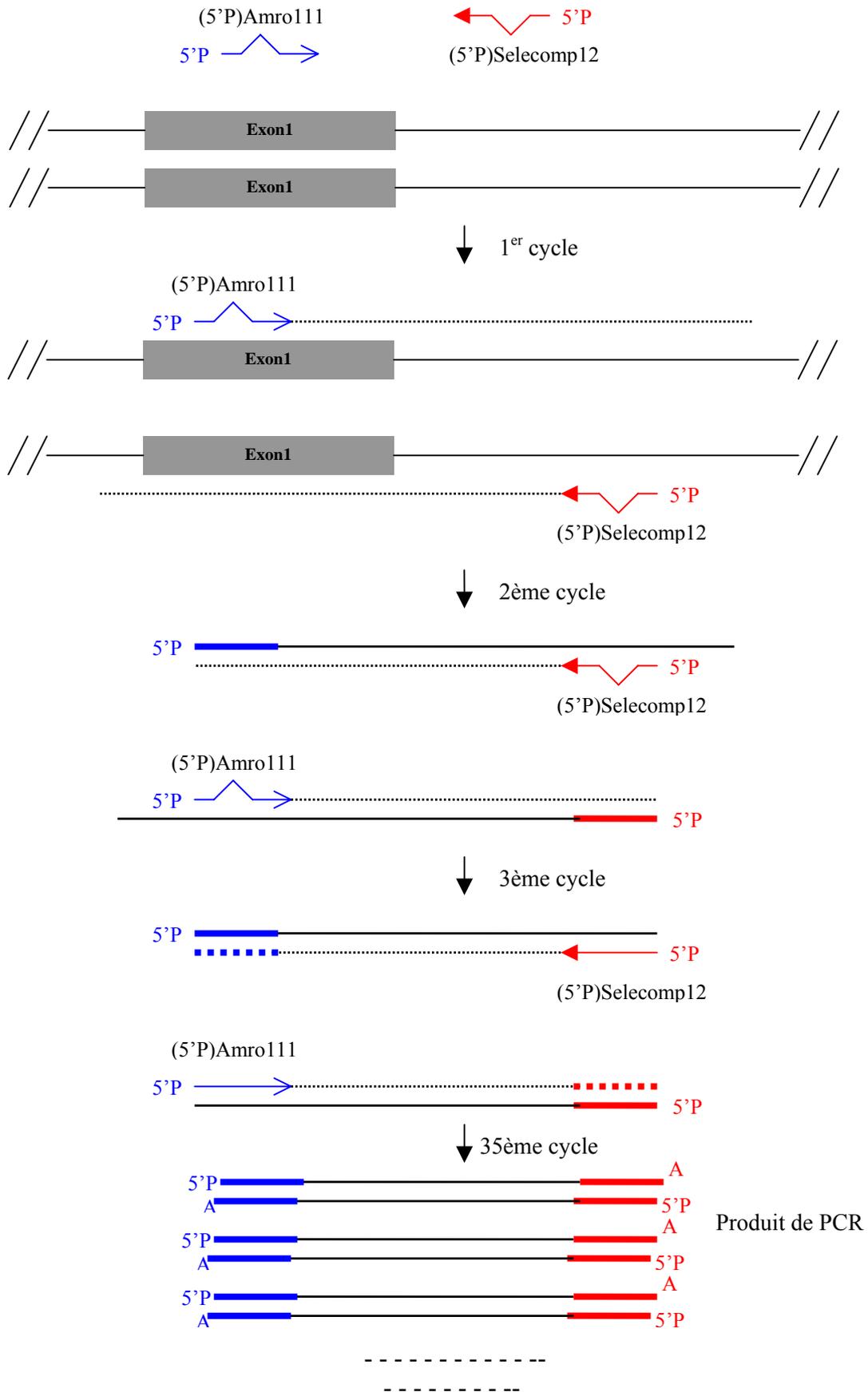
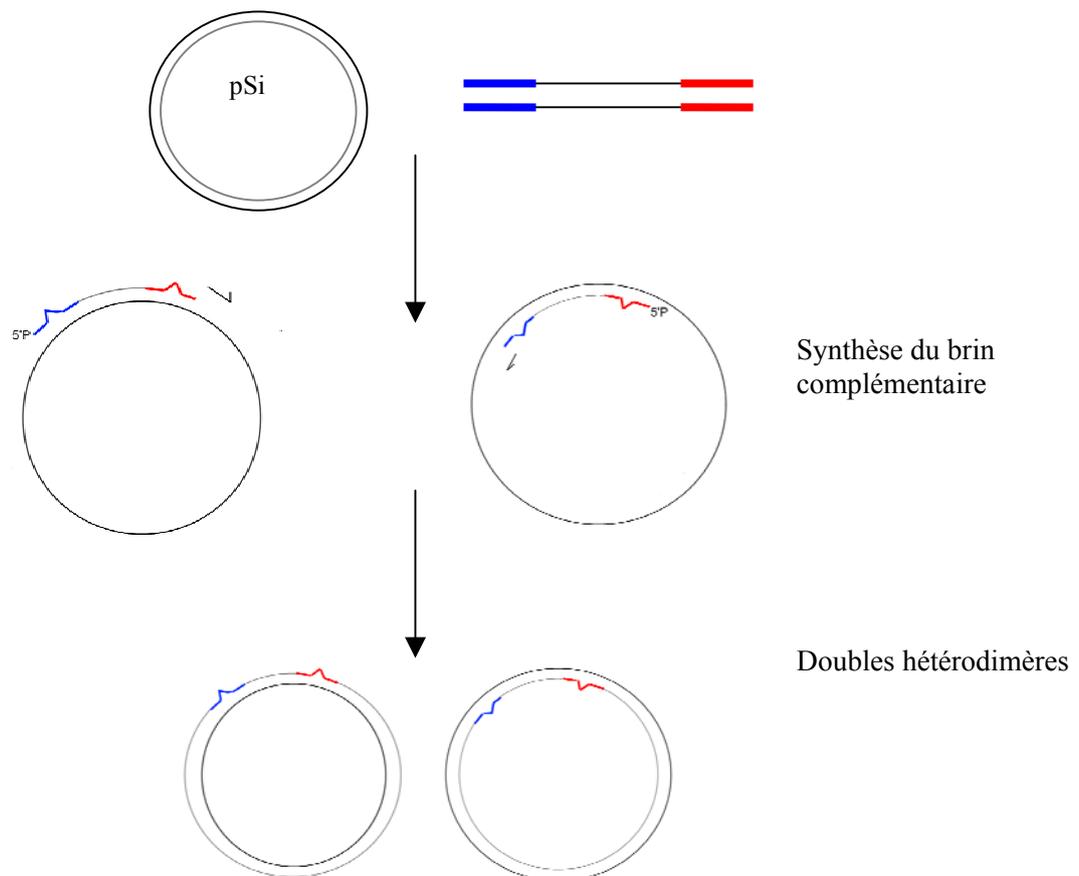


Figure 26 : schéma de PCR. Amro111/Selecomp12 : couple d'amorces

En revanche, la construction pSi2.1 destinée à contenir la substitution A61G (*Mut1*) (Figure 25), nous a posé des difficultés en appliquant le protocole de mutagenèse classique. Plusieurs essais avec différentes amorces et différentes conditions de mutagenèse (rapport et quantité des deux amorces, températures d'hybridation) ont été utilisés sans succès.

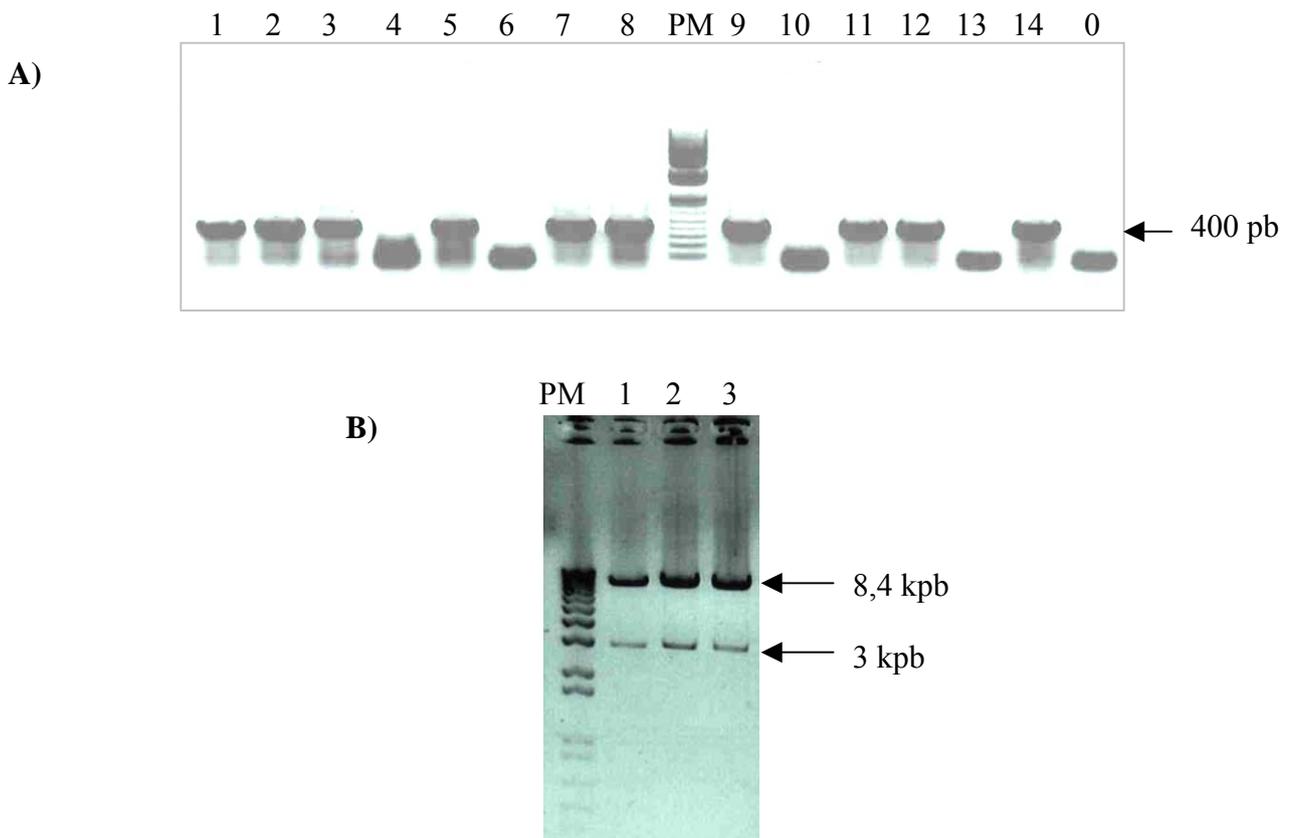
Nous avons résolu ce problème relatif à la construction pSi2.1 en ajoutant une étape supplémentaire et une modification du protocole classique. Nous avons effectué une PCR avec le couple d'amorces (5'P)Amro111/(5'P)Selecomp12 en utilisant le vecteur pSi comme ADN matrice (Figure 26). Ensuite, la mutagenèse est réalisée en utilisant le produit de PCR à la place des amorces de modification et de sélection habituelles (Figure 27). Dans les deux cas de mutagenèse, l'amorce de sélection ((5'P)SILVERSELECT1 et (5'P)Selecomp12) supprime le site *PciI* situé à 453 pb de l'exon 1 et crée à la place un site *SalI* et un site *BamHI*, utilisés pour le clonage de la cassette Néomycine (Figure 16). L'analyse par séquençage avec les amorces MEL6 et MEL10 des vecteurs négatifs pour la digestion *PciI*, a montré l'incorporation de la mutation souhaitée dans la séquence de l'exon 1 (Figure 25).



**Figure 27 : schéma de mutagenèse dirigée par fragment de PCR**

### III.1.4 Clonage de la cassette Thymidine kinase

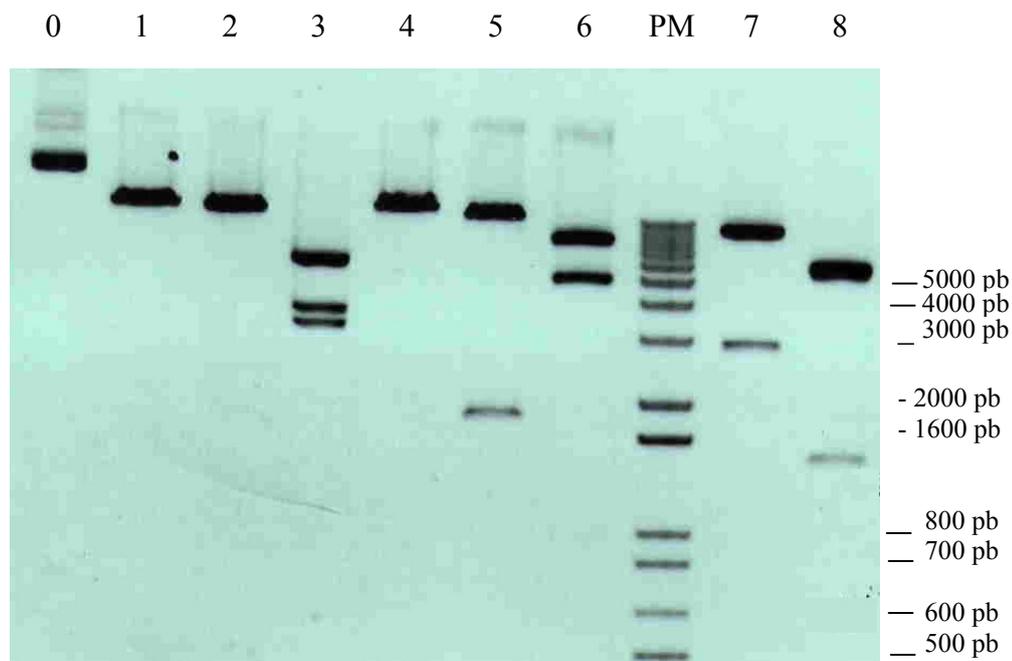
La cassette Thymidine kinase sert dans une étape ultérieure à la sélection négative. Ainsi, après transfection des cellules souches embryonnaires avec le vecteur de ciblage, les clones recombinants qui expriment la Thymidine kinase meurent en présence de Gancyclovir. Le traitement au Gancyclovir a pour objectif d'éliminer une partie des clones recombinants avec des insertions aléatoires du vecteur de ciblage dans leur génome. La séquence codante pour la Thymidine kinase (TK) est libérée du vecteur PPNT-*frt3* par une double digestion *HindIII/XhoI*. La cassette est ensuite ligaturée dans le couple de sites *HindIII/XhoI* en 5' du fragment *Silver* pour pSi2.2 (Figure 16). Le criblage par PCR avec le couple d'amorces TK-5/M13F (Figure 18) a montré un grand pourcentage de clones positifs (Figure 28A). Les plasmides extraits seulement de clones positifs digérés par *HindIII/XhoI* libèrent la cassette TK clonée (Figure 28B). Ce résultat confirme la présence de la cassette TK dans le vecteur pSi3.2.



**Figure 28 :** A) Les 14 clones résistants. Le puit 0 contenant le mixte PCR sans ADN, est un témoin négatif B) Les puits 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux clones 1, 2 et 3 digérés par le couple enzymatique *Hind3/XhoI*, libérant ainsi un fragment de 3 kpb (TK) et un deuxième de 8,4 kpb. PM : poids moléculaire 1Kb+.

### III.1.5 Clonage de la cassette Néomycine

La cassette Néomycine sert dans une étape ultérieure à la sélection positive des clones ES recombinants et par conséquent résistants à la Néomycine. Elle est libérée du vecteur PPNT-*frt3* par la double digestion enzymatique *SalI/BamHI*. L'insert est cloné dans le couple de sites *SalI/BamHI* créé au sein de la séquence intronique à 453 pb de l'exon 1 (Figure 16). Le criblage par PCR (SiNeoF/Neo-5) (Figure 18) révèle les clones recombinants. Les clones positifs pSi4.2 sont vérifiés et validés par plusieurs digestions enzymatiques (Figure 29). Ce dernier constitue le vecteur de ciblage pour l'allèle *Mut2*.



**Figure 29 : validation de pSi4.2** 0) circulaire 1) linéarisé par *BamHI* : 13,2 kpb 2) linéarisé par *NotI* : 13,2 kpb 3) digéré *SpeI* : 3,2 kpb, 3,9 kpb et 6,1 kpb 4) linéarisé par *SalI* 5) digéré par le couple *BamHI/SalI* : 1,8 kpb et 11,4kpb 6) digéré par le couple *BamHI/HindIII* : 4,9 kpb et 8,3 kpb 7) digéré par le couple *HindIII/XhoI* : 2,9 kpb et 10,3 kpb 8) digéré par *EcoRI* : 1,4 kpb, 5,7 kpb et 6,2 kpb. PM : poids moléculaire 1Kb+

### III.1.6 Préparation du vecteur de ciblage pSi4.1

La préparation du plasmide pSi4.1 a été réalisée en remplaçant le fragment *HindIII/SalI* (*Mut2*) de pSi4.2 par le fragment *HindIII/SalI* (*Mut1*) de pSi2.1 (Cf. cartes de restriction sur la Figure 16). En effet, l'insert libéré du plasmide pSi2.1 par une double digestion *HindIII/SalI*, est cloné dans le vecteur pSi4.2 après digestion *HindIII/SalI*. Les clones résistants à l'ampicilline ont été validés par plusieurs digestions enzymatiques comme pour pSi4.2. Les clones recombinants sont confirmés par séquençage avec les amorces MEL6 et MEL10 (Figure 18). Cette construction constitue le vecteur de ciblage de l'allèle *Mut1*.

### III.1.7 Préparation du vecteur de ciblage pSi4.0

pSi4.0 est préparé en trois étapes. La première consiste à libérer le fragment *BstBI/SalI* contenant l'exon 1. L'étape suivante consiste à générer des bouts francs par l'action de la Klenow en présence de dNTP. Enfin, les vecteurs linéaires à bouts francs sont ligaturés seuls (Figure 30). Les clones recombinants sont criblés par PCR avec le couple d'amorces SiF5/NEO-5 (Figure 18). Les clones recombinants sont confirmés par cartographie avec différentes enzymes de restriction et sont validés par séquençage. Cette construction constitue le vecteur de ciblage Knock-out.

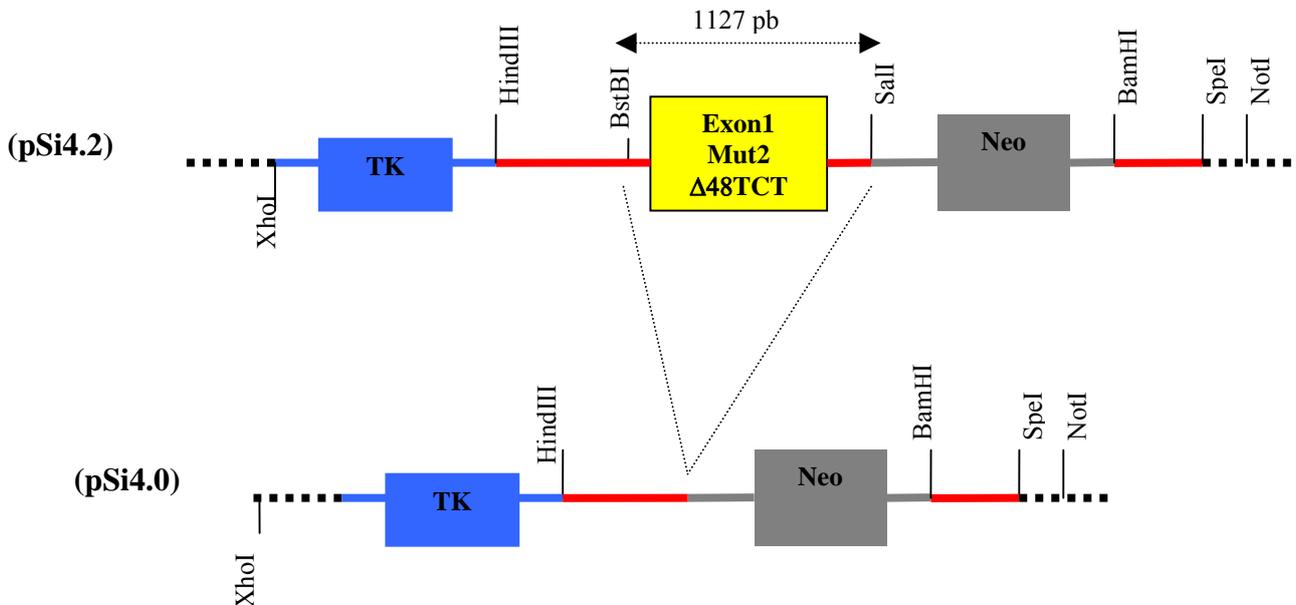


Figure 30 : schéma de préparation de pSi4.0. TK : Thymidine kinase, Neo : cassette de résistance à la Néomycine

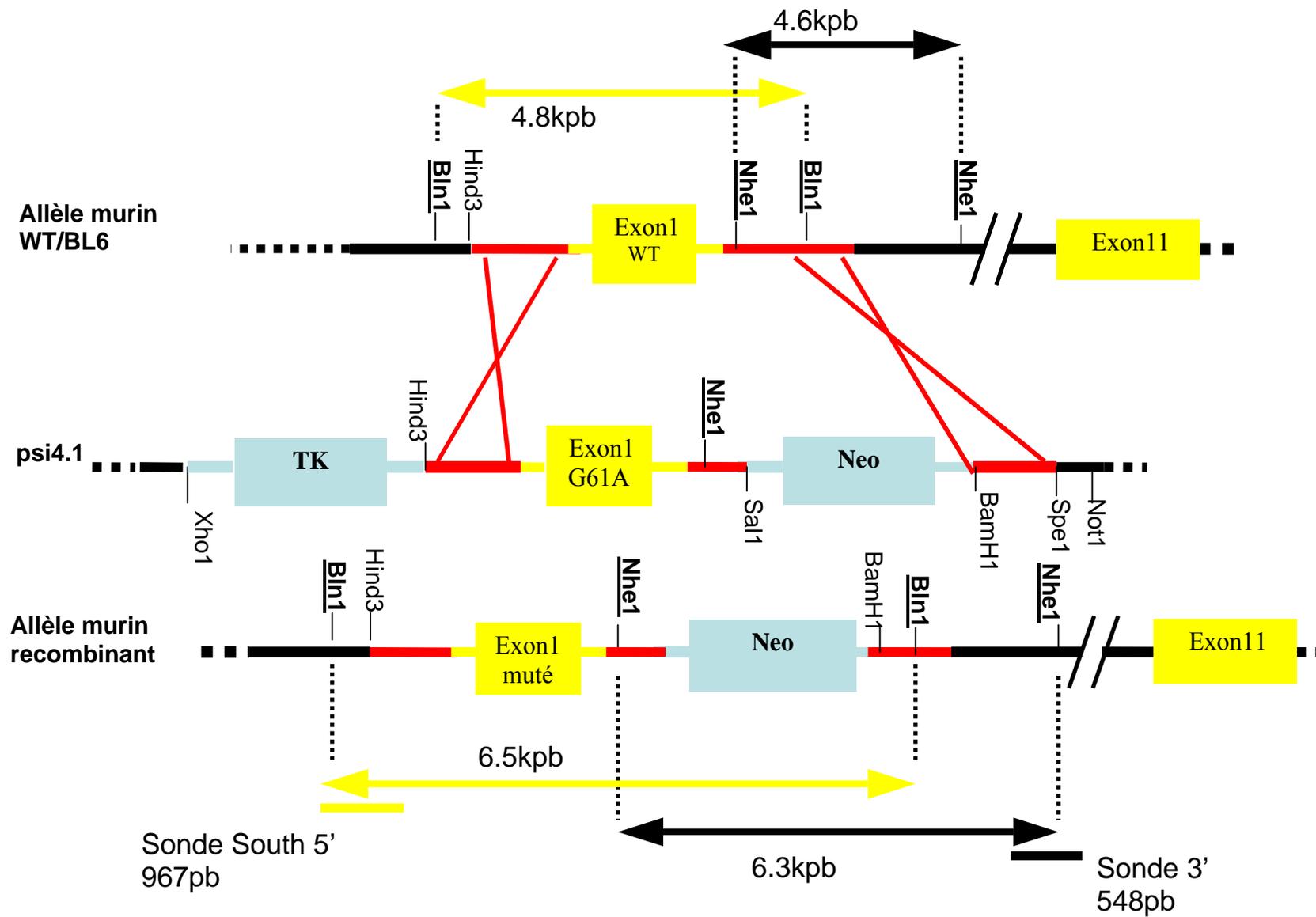


Figure 31 : un double évènement de crossing-over (ciblé au locus *Silver*) dans le cas de pSi4.1. En rouge : les séquences d'homologie.

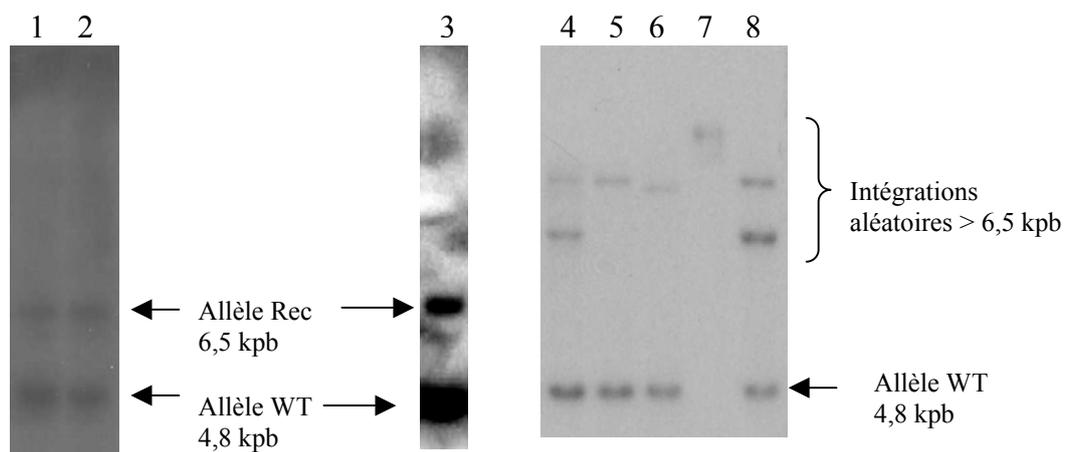
### III.1.8 Recherche de clones ES recombinants

Le but de cette étape se résume en l'introduction de la mutation d'intérêt dans le génome des cellules ES transfectées avec le vecteur de ciblage, par un double événement de recombinaison homologue (Gene-targeting).

Nous avons réalisé trois transfections des cellules ES avec pSi4.2 et deux autres avec pSi4.1. Nous avons isolé 500 clones résistants issus de pSi4.1 et 550 clones résistants issus de pSi4.2. Sur la totalité des clones résistants pour le Gancyclovir et la Néomycine, analysés par la technique Southern, seulement 800 échantillons d'ADN génomiques ont montré un résultat exploitable, parmi lesquels 360 proviennent de pSi4.1. Au cours de l'analyse des recombinants par Southern, nous étions confrontés à différents obstacles :

i) Des difficultés de digestion enzymatique des ADN. En effet l'enzyme utilisée était extrêmement sensible à la pureté des ADNs. Nous avons réussi à surmonter ce problème en modifiant le protocole de purification de l'ADN génomique. ii) Malgré la synchronisation des clones isolés, nous nous sommes retrouvés avec des quantités d'ADN variables entre les clones, et nous avons perdu certains clones dont l'analyse était inexploitable. iii) Un triplicata des clones isolés était stocké à -80 °C en plaque de 96 puits. Nous avons trouvé une difficulté à régénérer certains clones identifiés comme recombinants et trois clones ont été perdus.

Les clones recombinants, sont tout d'abord testés du côté 5' en technique Southern (page 56) avec la sonde South5' (Figure 31). Ceux identifiés recombinants en 5' présentent une bande à 4,8 kpb correspondant à l'allèle sauvage et une deuxième bande à 6,5 kpb correspondant à l'allèle recombiné. Deux clones recombinants en 5' pour *Mut2* et un clone recombinant en 5' pour *Mut1* sont identifiés (Figure 32).



**Figure 32 : Southern en 5'.** Les pistes 1 et 2 sont les clones recombinants pour l'allèle *Mut2*. Le puit 3 est le clone recombinant pour l'allèle *Mut1*. Les pistes 4 à 8 correspondent à des clones ayant reçu des intégrations aléatoires dans le génome. Rec : recombiné. WT : sauvage.

### **III.1.9 Analyse en 3'**

Les recombinants en 5' sont analysés ensuite du côté 3'. Nous avons rencontré des difficultés avec l'analyse du côté 3'. En effet, aucune sonde en 3' ne présente un résultat exploitable. Le profil Southern en 3' a montré un « smear ».

### **III.1.10 Aucun clone obtenu par un double évènement de crossing-over**

L'analyse du côté 3' est indispensable pour confirmer si un double évènement de crossing-over a eu lieu ou non. Nous avons réussi à surmonter ce problème, par une analyse du transcrit *Silver* de ces clones ES recombinants. Malheureusement, l'analyse par séquençage, avec l'amorce SIMCDNAES3R, d'ADNc préparé à partir de chacun des trois clones recombinants, n'a révélé aucun clone hétérozygote. Les séquences des trois recombinants ne portent aucune des deux mutations (*Mut1* et *Mut2*) au niveau de l'exon 1 de *Silver*. Par conséquent, ces clones sont générés par un évènement de recombinaison illégitime.

### III.2 Discussion et perspectives

Nous avons entrepris l'approche « Gene-targeting » chez la souris pour une étude fonctionnelle du rôle de deux mutations faux-sens ciblant la séquence codante du peptide signal de la protéine Silver. La première mutation *Mut1* résulte en une substitution du résidu hydrophobe Glycine 21 par un résidu Arginine. Ce résidu Glycine en position -3 du site de clivage du peptide signal est crucial pour le clivage de ce peptide (Allison et *al.*, 1989). La deuxième mutation *Mut2* résulte en une délétion du résidu Leucine 17 hydrophobe. Il a été montré que la longueur d'un peptide signal est un facteur important pour sa fonction. De même, la délétion du résidu Leucine altère l'hydrophobie du peptide. Les résultats attendus des souris transgéniques pour chacune des deux mutations pourraient apporter des informations intéressantes et concluantes :

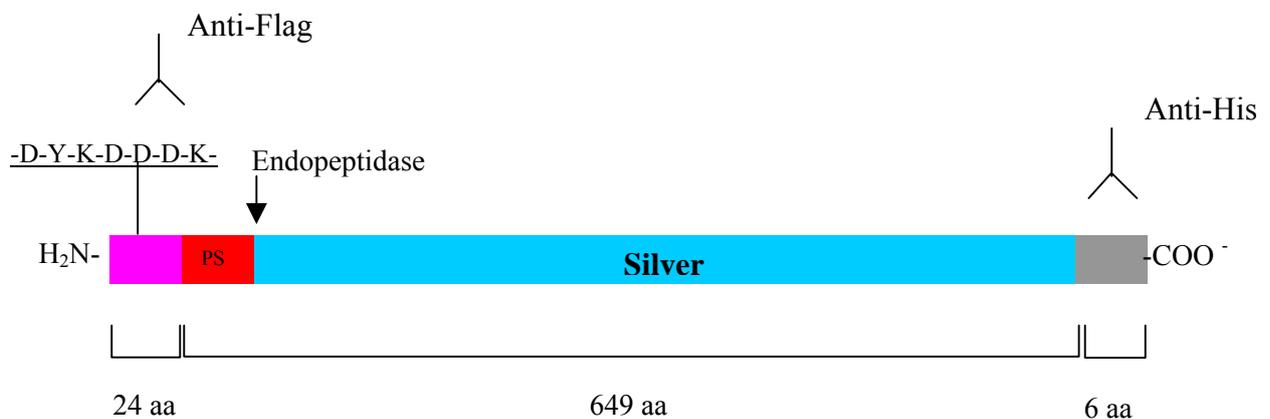
1. Coloration : L'approche « Gene-targeting » chez la souris, aurait pu démontrer que la mutation *Dc* identifiée est causale de la dilution de la robe de la race Charolaise.
2. L'ouïe : dans l'objectif de rechercher des effets pléiotropes des deux mutations étudiées, nous étudierons une surdité potentielle, chez les souris. Une surdité décrite chez le chien par Clark et *al.* en 2006, est causée par des mutations du gène *Silver*.
3. Interaction avec d'autres gènes de la pigmentation : le croisement de la souris, modifiée pour une des deux mutations, avec des souris présentant d'autres mutations connues pourrait nous éclaircir sur l'interaction de *Silver* avec d'autres marqueurs de la coloration.

L'analyse par Southern en 5' de plus de 800 clones recombinants, n'a révélé la présence que deux recombinants *Mut2* et d'un recombinant *Mut1*. Ces recombinants n'ont pas pu être validés en 3'. Le Southern en 3' a montré une forte hybridation aspécifique pour deux sondes différentes utilisées séparément. Cette hybridation aspécifique se manifeste par un « smear » rendant les résultats inexploitable. L'analyse *in silico* de la région 3' a montré une forte présence de séquences répétées dans le génome de la souris. La richesse en séquences répétées explique le problème rencontré en 3'. La conception de sondes différentes en 3' n'a pas été possible du fait de la carte de restriction enzymatique de la région.

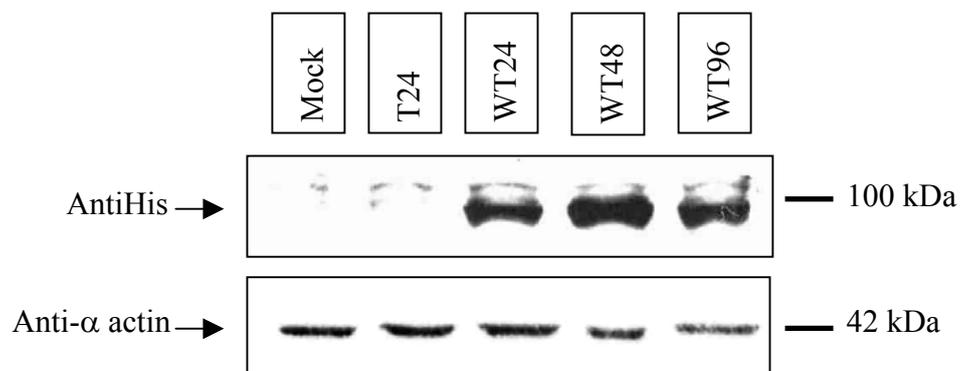
Nous avons choisi d'étudier la séquence des transcrits de *Silver* issus des 3 clones ES recombinants en 5'. L'analyse des trois transcrits par séquençage, a montré l'absence d'hétérozygotie ou d'homozygotie pour chacun des deux allèles mutants (*Mut1* et *Mut2*).

Malgré le grand nombre de recombinants analysés nous n'avons observé aucun clone issu d'un double événement de crossing-over. Ceci est expliqué par la forte présence de séquences répétées sur le bras droit de la séquence de ciblage, qui risquent de favoriser des recombinaisons homologues avec leurs homologues présents dans le génome (Biet et *al.*, 2003). Ces recombinaisons homologues entre séquences répétées se font à la place de la recombinaison homologue ciblant le gène *Silver* d'intérêt. Ainsi, la fréquence de recombinaison ciblant *Silver* est réduite par la présence de ces séquences répétées. Ce problème peut être traité en raccourcissant le fragment de ciblage droit afin d'éliminer les séquences répétées. Par ailleurs, l'approche « Gene-targeting » peut être appliquée par une méthode alternative. Il s'agit d'utiliser des oligos d'une taille variant entre 30 et 60 nucléotides (Dekker M. et al, 2003 ; Arts M. et al, 2006 ; Biet et *al.*, 2003). Les cellules ES (Msh2 -/-) déficientes pour le système de réparation de Mismatch seront transfectées par ces oligos, et la mutation souhaitée s'introduira dans le génome d'une manière ciblée, dont le mécanisme moléculaire reste inconnu. Cette technique présente plusieurs avantages : 1) elle dispense de toute l'étape de préparation de vecteur de ciblage 2) le criblage est simplifié en PCR nichée 3) elle présente une fréquence de modification nettement supérieure (10 à 50 fois), comparativement à l'usage de long fragment d'ADN double brin. Cependant cette technique bien qu'elle soit idéale dans son principe, reste peu appliquée. A la suite de cette approche « souris » qui n'a pas apporté de réponse à notre objectif, nous avons entrepris une approche *in vitro*.





**Figure 33 : représentation schématique de la structure primaire de la protéine Silver bovine recombinante sauvage (WT) de taille totale 679 aa. Le peptide signal (PS) est constitué de 24 acides aminés.**



**Figure 34 : détection de la protéine Silver recombinante à trois temps par western blot. L'actine sert de témoin protéique. Mock : les cellules HEK293 transfectées avec le vecteur d'expression vide. T24 : les cellules HEK293 non transfectées. WT24, WT48 et WT96 : extraits protéiques des cellules HEK293 transfectées avec la forme sauvage (Wild type) de Silver, respectivement aux temps 24 heures, 48 heures et 96 heures post transfection. 10  $\mu$ g de lysat protéique ont été déposés par puit.**

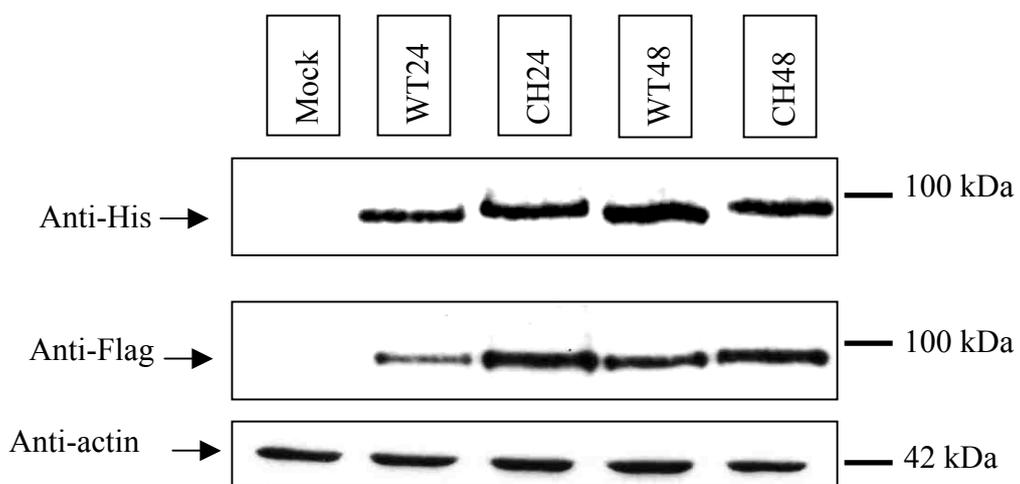
### **III.3 Approche cellulaire *in vitro***

Nous avons choisi d'étudier l'effet potentiel de la mutation Charolaise par une approche *in vitro*. L'hypothèse émise est que la mutation Charolaise possède un effet inhibiteur sur le clivage du peptide signal.

Nous avons exprimé la protéine bovine recombinante Nter-Flag-Silver-6xHis-Cter (Figure 33), en ces deux formes sauvages et mutantes, transitoirement dans des cellules HEK293 (cellules embryonnaires de reins humains) couramment utilisées comme système d'expression. Nous avons également utilisées des cellules Melan-a-si (Mélanocytes provenant de souris C57Bl6 porteuses de la mutation du gène *Silver*). Un lysat total de ces cellules est effectué à différents temps d'expression de la protéine ; 24 heures, 48 heures et 96 heures après transfection. Nous n'avons pas réussi à exprimer la protéine dans les cellules Melan-a-si.

#### **III.3.1.1 Expression de la protéine Silver bovine dans HEK293**

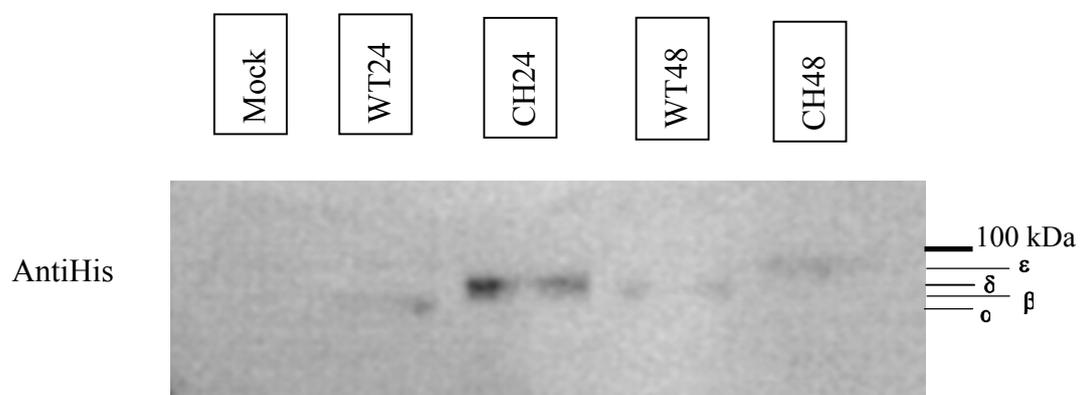
La protéine Silver WT (sauvage) bovine recombinante apparaît à partir de 24 heures post-transfection. Elle est exprimée également à 48 heures et à 96 heures post-transfection. Au cours des trois temps, l'expression de la protéine est suffisamment élevée pour être détectée. L'anticorps Anti-His, dirigé contre la queue 6xHis qui est fusionnée en C-terminal de la protéine Silver, reconnaît une seule bande spécifique de l'ordre de 95 kDa. Cette bande correspond à la forme iPmel17 décrite chez l'homme entre autres par Yasumoto et *al.* en 2004. Une seule bande de la protéine Silver apparaît sur le western blot (Figure 34).



**Figure 35 :** détection des deux formes, sauvage (WT) et mutante (CH) de la protéine Silver recombinante à 24h et à 48h par western blot. La rangée d'actine sert de témoin protéique. 10  $\mu$ g de lysat protéique ont été déposés par puit.

### **III.3.1.2 Détection de la protéine Silver mutante**

Les deux formes protéiques recombinantes de Silver WT et mutante sont exprimées à deux temps 24h et 48h post-transfection. L'anticorps Anti-His détecte une seule bande de taille voisine pour chacune des deux formes. L'anticorps Anti-Flag dirigé contre le peptide Flag fusionné en N-terminal de la protéine Silver, détecte une bande spécifique unique de l'ordre de ~ 95 kDa correspondant aux deux formes WT et mutante CH (Figure 35). Il est à noter une légère différence de masse de cette bande entre les échantillons WT et CH pour les deux temps.



**Figure 36 : migration plus longue.** 10  $\mu$ g de lysat protéique ont été déposés par puit.

### **III.3.1.3 Effet de la mutation sur le clivage du peptide signal**

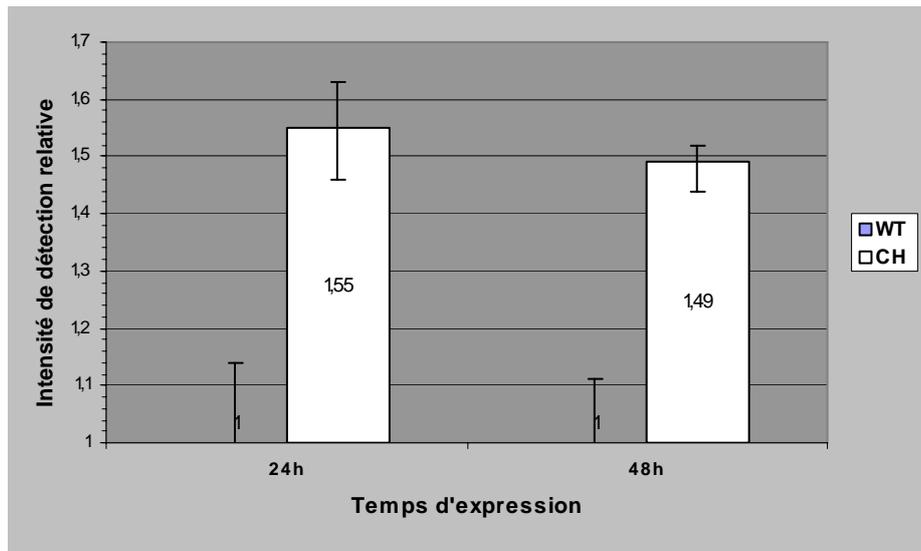
Afin de mieux étudier la légère différence de masse observée (Figure 35), le western blot a été refait avec Anti-His mais avec une migration plus longue. Dans ce cas, on distingue quatre niveaux de bandes que nous avons désigné par  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (Figure 36). La différence de masse entre les deux niveaux extrêmes  $\alpha$  et  $\epsilon$  est estimée à  $\sim 4$  kDa. A temps 24 heures, la protéine Silver d'origine Charolaise est de masse supérieure à la protéine sauvage. Ceci reste valable à temps 48 heures. Cette différence de masse identifiée entre les deux formes protéiques avec l'anticorps Anti-His n'est pas observée avec l'Anti-Flag. Elle est certainement due à la non coupure du peptide signal en N-terminal de la protéine Silver Charolaise. De plus, la protéine Silver sauvage à temps 48 heures a un poids moléculaire plus élevé qu'à 24 heures, ce qui implique un niveau de glycosylation plus important. Le non clivage du peptide signal n'a pas empêché la protéine Silver à 48h (CH48) d'acquérir un niveau de glycosylation plus élevé qu'à 24 heures (CH24).

### III.3.1.4 Estimation du degré d'inhibition causé par la mutation Charolaise

Nous avons estimé le rapport d'intensité relative de chaque échantillon détecté par l'Anti-His et l'Anti-Flag par rapport au signal de l'Anti-actine. L'actine est choisie comme la protéine de référence et de correction. Le signal détecté par l'Anti-His reflète l'ensemble de protéines Silver dont le peptide signal a été clivé (forme *clivée*) ou non (forme *complète*). D'autre part, le signal révélé par l'Anti-Flag reflète seulement la population de protéines Silver dont le peptide signal n'a pas été clivé. Cette analyse est effectuée à l'aide du logiciel Imagequant TL (Amersham). L'étude réalisée en triplicat a montré une prédominance de la forme *complète* de Silver dans le cas du Charolais par rapport au sauvage ( $RQ_{CH}/RQ_{WT}$ ) d'un ordre de 1,6 fois à temps 24 heures et 1,5 fois à temps 48 heures (Tableau 3 et Figure 37). Ceci est en accord avec le résultat trouvé précédemment.

**Tableau 3 : Quantités relatives des formes clivée et complète de Silver.**

Essais	RQ(AntiFlag/AntiHis)		RQ <sub>CH24</sub> /RQ <sub>WT24</sub>	RQ(AntiFlag /AntiHis)		RQ <sub>CH48</sub> /RQ <sub>WT48</sub>
	WT24	CH24		WT48	CH48	
1	0,24	0,39	1,63	0,28	0,42	1,50
2	0,32	0,50	1,56	0,25	0,36	1,44
3	0,28	0,41	1,46	0,31	0,47	1,52
Moyenne			<b>1,55</b>			<b>1,49</b>



**Figure 37 : représentation schématique du tableau 3.** Prédominance de la forme non clivée dans l'échantillon Charolais (CH) muté d'un niveau ~ 50 % supérieur par rapport à l'échantillon sauvage (WT) aux deux temps 24 h et 48 h. Test de Student significatif: n = 3 et p = 0,24 %.

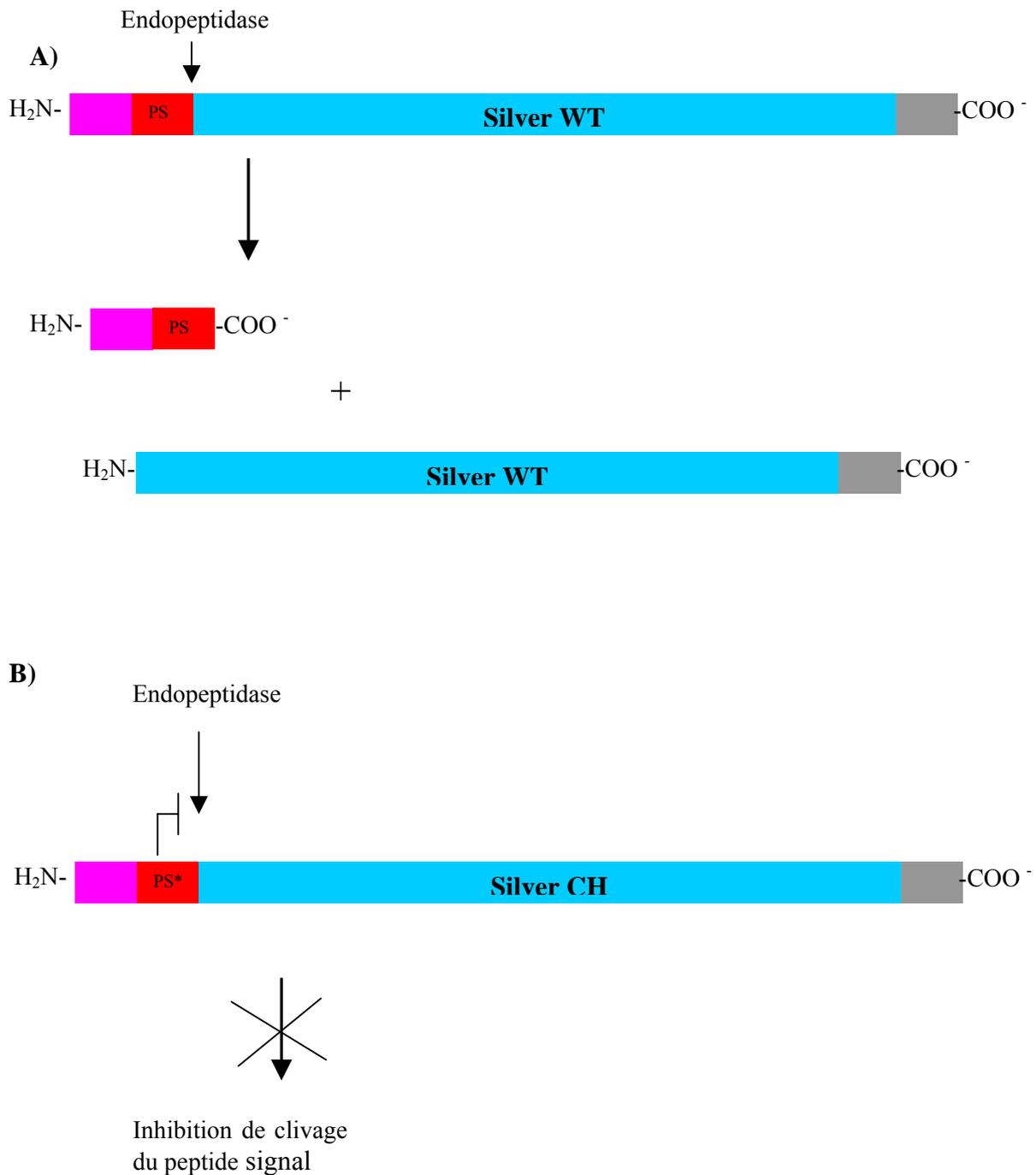
### III.3.2 Discussion et perspectives

L'approche souris ne nous a pas permis d'atteindre le résultat escompté ; nous avons entrepris une approche cellulaire en exprimant la protéine Silver sauvage et le variant propre à la race Charolaise dans un système hétérologue de cellules embryonnaires de reins humains (HEK293). Pour détecter l'expression et éventuellement des différences de maturation des deux protéines, en l'absence d'anticorps spécifique pour la protéine Silver, nous les avons produites sous forme recombinantes avec un marquage spécifique au niveau des extrémités N-terminal et C-terminal. L'avantage de l'utilisation de tag, est d'obtenir une reconnaissance spécifique dans un système de production eucaryote et une interaction anticorps-épitope de forte affinité (ex : penta-His,  $K_d = [5 \times 10^{-8} ; 10^{-9}]$ ). Etant donné la localisation des tags, leurs interactions avec des anticorps spécifiques ne sont probablement pas altérées par la structure tertiaire de la protéine et demeurent insensibles aux niveaux de la glycosylation de la protéine.

L'expression transitoire de ces deux protéines et l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre l'une ou l'autre extrémité, nous a permis de détecter une des formes de la protéine Pmel17 décrites dans la littérature (Yasumoto et *al.*, 2004) en l'occurrence iPmel17 ~ 95 kDa. L'absence ou plus exactement la non détection des autres formes serait inhérente aux cellules d'expression (HEK293) utilisées qui ne disposeraient pas de facteurs appropriés ou une caractéristique intrinsèque de Pmel17 bovine. Cependant la conservation des différents sites de clivages de Pmel17 bovine, humaine et murine et qui sont impliqués dans la production de ses diverses formes, semble écarter la dernière hypothèse. L'usage d'autres lignées cellulaires pourrait confirmer la première hypothèse.

Les deux formes protéiques Pmel17 bovines produites ne diffèrent que par la substitution d'un acide aminé en l'occurrence, le remplacement d'une glycine par une arginine en position 22 (Gly22Arg), localisée exactement en position -3 par rapport au site de clivage du peptide signal par une endopeptidase.

La détection par western blot des deux formes avec des anticorps dirigés contre l'extrémité N-ter ou C-ter révèle un retard de migration de la protéine mutante (Pmel17 Charolais) dans le deuxième cas. Ce retard de migration n'est pas observable en utilisant l'anticorps dirigé contre la partie N-terminal. La seule substitution d'un acide aminé n'explique pas le retard de migration entre la forme mutante et la forme sauvage produites.



**Figure 38 : schéma de clivage du peptide signal.** A) cas de la protéine sauvage WT. B) cas de la protéine Charolaise mutée (CH) : la mutation en position -3 du peptide signal (PS\*) inhibe l'activité endopeptidasique

Dans les mêmes conditions expérimentales, le niveau de glycosylation n'en serait pas non plus responsable. Par ailleurs, la substitution en soi ne constitue pas l'apparition d'un site de glycosylation supplémentaire dans le cas de la forme mutante.

L'explication que l'on peut proposer aujourd'hui, reste l'élimination ou plus exactement la différence d'efficacité de clivage du peptide signal des protéines sauvage et mutante. Cette explication plausible est confortée par le fait que la différence de migration entre les deux protéines est détectable seulement en utilisant l'anticorps dirigé contre l'épitope de la partie C-terminal. Par ailleurs, il est bien établi aujourd'hui que le remplacement d'un acide aminé neutre, en l'occurrence la glycine, par un acide aminé chargé, en l'occurrence l'arginine, en position -3 par rapport au site de clivage de la séquence signal affecte l'élimination de cette dernière par une endopeptidase (Allison et *al.*, 1989) ; ce qui expliquerait la différence de migration entre les formes sauvage et mutante (Figure 38).

La quantification par densitométrie nous a permis d'estimer le niveau d'inhibition du clivage du peptide signal à environ 50 %. Ce résultat reste néanmoins à confirmer par d'autres approches complémentaires, une étude cinétique de l'activité endopeptidase *in vitro* par exemple.

Par ailleurs, il serait prioritairement intéressant d'étudier les conséquences de cette inhibition à l'échelle des organites cellulaires. Il s'agit de rechercher *in situ* la localisation subcellulaire des deux formes protéiques dans différents compartiments cellulaires par immunocytochimie : le RE, le Golgi, l'Endosome et la membrane plasmique (Harper et *al.*, 2008 ; Valencia et *al.*, 2007). Cette étude peut être réalisée en exprimant la protéine Silver (sauvage et mutante), fusionnée avec une séquence c-Myc à son extrémité C-terminal, afin de pouvoir suivre sa localisation par rapport à des marqueurs subcellulaires.

L'ensemble de ces expériences complémentaires qui restent à réaliser sont indispensables pour démontrer que le blocage de la maturation au stade prémélanosome observé en microscopie électronique par Carlo Renieri et *al.* en 1993, est associé à la mutation au niveau de la région codant le peptide signal du gène *Silver* de la race Charolaise ; en d'autres termes, la mutation est causale ou non.



### **III.4 Etude du changement de couleur de la robe chez le bovin : Cas particulier de la race Gasconne**

La race Gasconne française, mais également certaines races bovines italiennes (Chianina, Piémontaise,..) se caractérisent par un changement de la couleur de la robe. En effet, le veau naît rouge, devient progressivement gris et présente une couleur de robe complètement grise (mélange de poils blancs et noirs) six mois après la naissance (Figure 39).

Dans l'objectif d'élucider les mécanismes moléculaires responsables de ce changement de couleur, nous avons tenté d'apporter les premiers éléments de réponse *via* une approche transcriptomique. Ainsi, une analyse quantitative des transcrits de gènes qui seraient exprimés de façon différentielle quinze jours après la naissance (couleur de robe rouge) et six mois après la naissance (couleur de robe grise), a été entreprise.

Nous avons en particulier émis l'hypothèse qu'une variation de l'expression du gène *Agouti* entre ces deux périodes, de part son rôle avéré dans la synthèse des phéomélanines (pigments rouges), serait responsable de ce changement de couleur. Nous avons également analysé les transcrits des gènes *TfIIId* (gène endogène invariant), *Mclr* (le récepteur du gène *Agouti*) et les trois gènes *Tyr*, *Trp1* et *Trp2*, codant les enzymes de la famille tyrosinase (cibles de la transduction des signaux *via* *Agouti*). L'expression du gène *Silver* a également été analysée, de part son implication dans le phénomène de dilution de la couleur chez le bovin. La variation d'expression de ces gènes a été étudiée par rapport au gène de référence *Gapdh* (Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase).

#### **III.4.1 Expression avant et après changement de couleur**

Il est à noter que notre objectif est d'identifier une expression différentielle de gènes qui serait responsable du changement de couleur chez les animaux de la race Gasconne. Les variations individuelles ne sont pas considérées dans ce contexte. Ainsi, pour pallier ces variations individuelles, nous avons choisi de travailler avec un mélange proportionnellement égal d'ARNs issus de peaux de trois veaux rouges de même âge (15 jours), comparativement à des ARNs issus de peaux de ces mêmes veaux, 6 mois après le changement de couleur. Ces mélanges seront désignés respectivement, « pool rouge » et « pool gris », pour les mélanges d'ARNs de peau de veaux rouges et ceux d'ARNs de peau de ces mêmes veaux devenus gris six mois après la naissance.

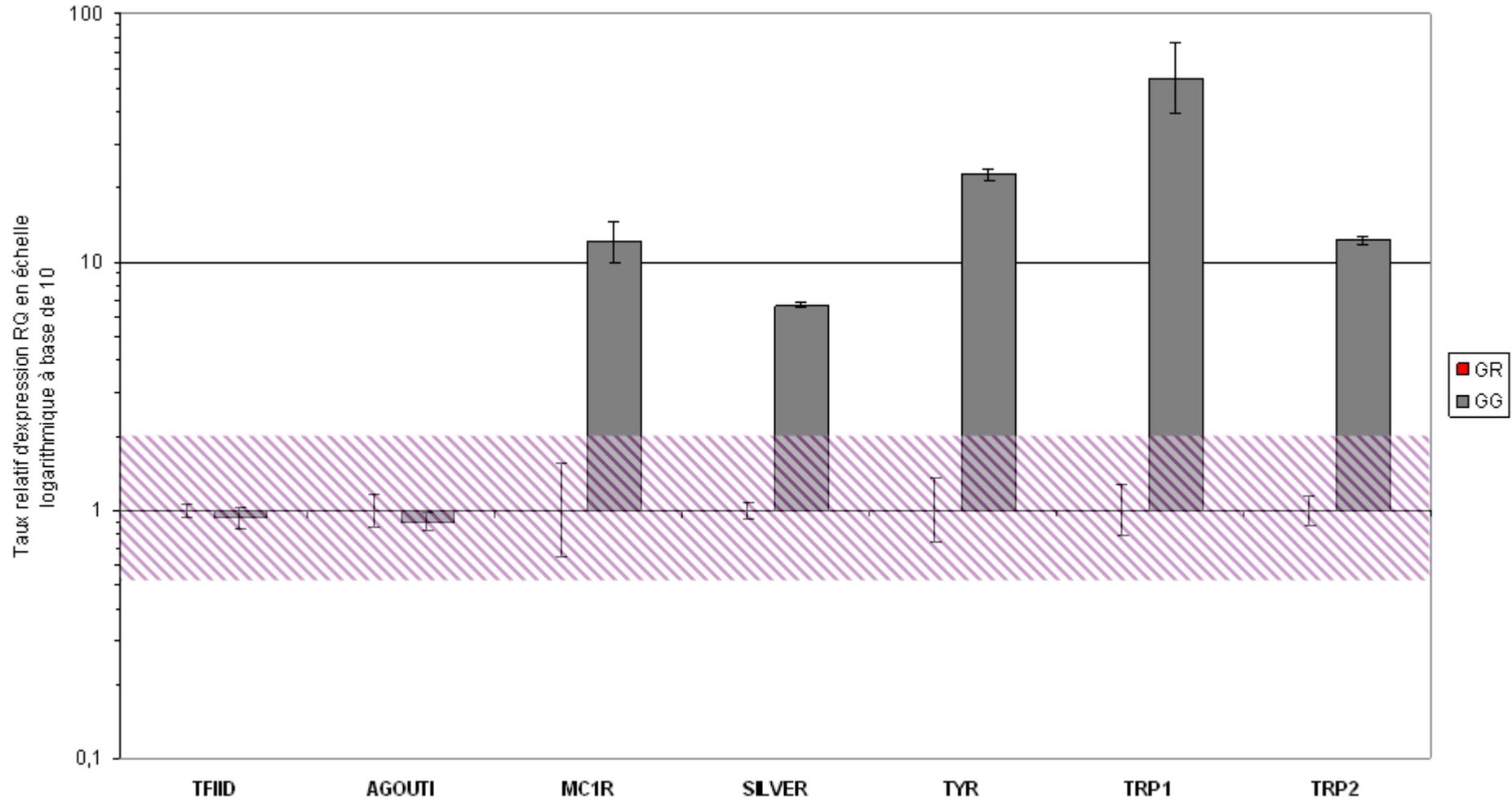
**A)**



**B)**



**Figure 39 :** A) Un veau Gascon rouge à 15 jours. B) Le même veau Gascon devenu gris 6 mois après naissance.



**Figure 40 : niveau d'expression des gènes de coloration : *Agouti*, *Mc1r*, *Silver*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2* du pool gris (GG) par rapport au pool rouge (GR) de référence. Une variation significative en dehors de la zone hachurée correspond à une valeur en dessous de 0,5 (sous-expression) ou en dessus de 2 (surexpression). Les histogrammes de la référence GR correspondent à la valeur 1. Ils n'apparaissent pas sur le graphe.**



**Zone de variation non significative**

### III.4.1.1 Etude de l'expression du gène *Agouti*

L'étude est effectuée en calculant le taux relatif d'expression de chacun des gènes étudiés au sein du « pool gris » par comparaison à leur expression dans le « pool rouge » comme échantillon calibrateur (échantillon de référence) car correspondant aux veaux à la naissance. L'expérience comporte trois points de mesure et, chacune est répétée également en trois fois. Ainsi, les trois valeurs RQ (relative quantification), RQmin et RQmax calculées par le logiciel, résultent de 9 points expérimentaux : RQ représente la valeur moyenne des points expérimentaux, schématisé par les barres de l'histogramme, RQmin représente le taux relatif d'expression le plus faible et RQmax représente le taux relatif d'expression le plus élevé. Sur le graphe (Figure 40), RQ est représenté par l'histogramme. RQmin et RQmax sont les limites expérimentales de la barre d'erreur sur l'histogramme.

L'analyse du niveau d'expression du gène *Agouti* n'a pas révélé de différence entre les deux pools d'ARNs. Par ailleurs, le taux relatif d'expression du gène *Tfllid* (contrôle négatif) ne présente pas de différences significatives par rapport à celui de *Gapdh* (référence) (Figure 40). Le témoin négatif est validé. Ces résultats suggèrent que le changement de couleur chez la Gasconne (rouge/gris) ne serait pas dû à une expression différentielle du gène *Agouti*, malgré le rôle avéré de ce dernier dans la synthèse des phéomélanines (pigments rouges/jaunes). Néanmoins, ces données n'excluent pas l'implication des modifications post-traductionnelles et/ou de régulations post-transcriptionnelles éventuelles d'*Agouti*.

### III.4.1.2 Etude de l'expression des gènes *Mc1r*, *Silver*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2*

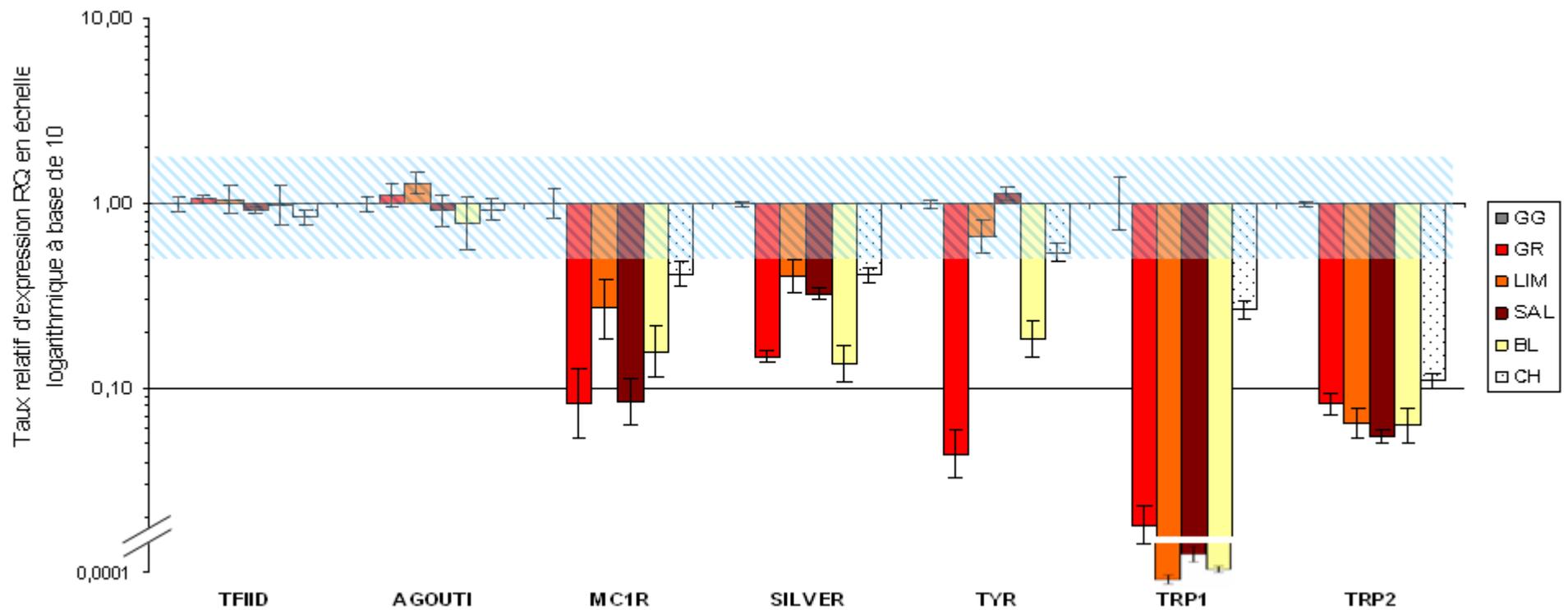
Les pigmentations noires et rouges sont souvent corrélées respectivement avec une augmentation et une diminution de l'expression de gènes de coloration. Aussi, nous avons décidé d'étendre notre analyse à d'autres gènes : *Mc1r*, *Silver*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2* sur les pools « rouges » et « gris », mais également à d'autres races de différentes couleurs de robes.

Les résultats obtenus montrent une surexpression systématique dans le « pool gris » par rapport au « pool rouge » pour l'ensemble des 5 gènes étudiés (Figure 40). Ainsi, les gènes *Mc1r*, *Silver*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2* sont surexprimés respectivement d'un facteur 12 - 6,5 - 22 - 55 et 12. Le facteur de surexpression élevé du gène *Trp1* révèle en fait une très faible expression de ce gène dans le « pool rouge ».

### III.4.2 Variations d'expression entre le pool de Gasconnes grises et des races à robe rouge

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'expression des gènes étudiés entre des races qui présentent une couleur de robe rouge (incluant le veau Gascon rouge) par rapport au Gascon gris. L'appellation « robe rouge », est attribuée aux races dont la robe est constituée majoritairement de phéomélanines. Elle reste propre à notre étude. Les quatre races bovines rouges à l'âge adulte sont, la Limousine (2 animaux), la Salers (1 animal), la Blonde d'Aquitaine (2 animaux) et la Charolaise (2 animaux). De plus cette fois ci, le pool de GG est utilisé comme échantillon calibrateur. Les mesures quantitatives sont effectuées d'une manière individuelle sur les animaux d'une même race (races à robe rouge). A titre d'exemple, la race Limousine est représentée par 18 points expérimentaux provenant des deux animaux (9 points par animal). L'analyse combinée par race est effectuée à l'aide du logiciel SDS 2.2.2 (Applied Biosystems).

Le gène *TfIIId* n'a montré aucune réelle variation par rapport au gène de référence *Gapdh*, pour l'ensemble des échantillons étudiés (GR, GG, Limousine, Salers et Blonde d'Aquitaine) (Figure 41). Ce résultat valide le témoin invariant. Concernant le gène *Agouti*, nous observons un niveau d'expression sensiblement stable pour l'ensemble des races étudiées par rapport au pool de GG. En revanche, le gène *Mclr* est sous-exprimé dans l'ensemble des échantillons analysés, à savoir comme déjà décrit dans le pool de GR (expression 12 fois inférieure), mais également dans les races Limousine (expression 4 fois inférieure), Salers (expression 12 fois inférieure), Blonde d'Aquitaine (expression 6 fois inférieure) et Charolaise (expression 2,4 fois inférieure). Cependant, la sous-expression observée pour le « pool rouge », la Limousine et la Blonde d'Aquitaine bien que significative, ne peut pas être réellement considérée quantitative du fait des valeurs de Ct (nombre de cycles suffisant pour atteindre un seuil de détection) élevées pour chacun des échantillons. En effet, des valeurs de Ct élevées indiquent une très faible quantité, voire une absence d'ARNs (Ct  $\geq$  40 cycles), ce qui peut interdire toute quantification chiffrée. De même, nous observons une sous-expression du gène *Silver* dans l'ensemble des échantillons analysés, à savoir dans le pool de GR (expression 6,5 fois inférieure) comme déjà décrit, mais également dans les races Limousine (expression 2,5 fois inférieure), Salers (expression 3 fois inférieure), Blonde d'Aquitaine (expression 7,4 fois inférieure) et Charolaise (expression 2,5 fois inférieure).



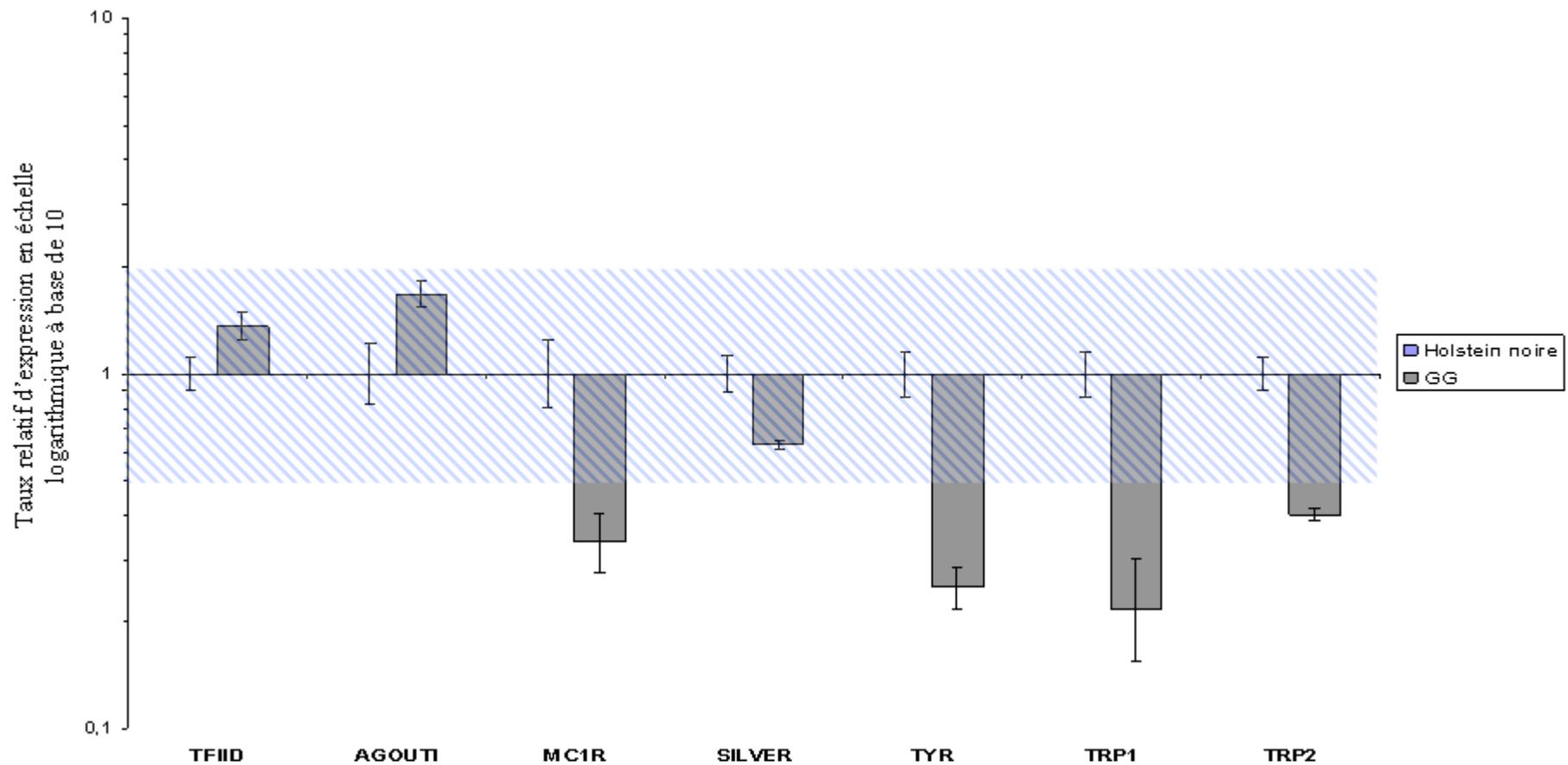
**Figure 41 : niveau d'expression des gènes de la coloration** du groupe rouge, pool rouge (GR), Limousine (LIM), Salers (SAL), Blonde d'Aquitaine (BL) et Charolaise (CH) par rapport au pool gris (GG) de référence. Une variation significative en dehors de la zone hachurée correspond à une valeur en dessous de 0,5 (sous-expression) ou en dessus de 2 (surexpression). Les histogrammes de la référence GG correspondent à la valeur 1. Ils n'apparaissent pas sur le graphe.



**Zone de variation non significative**

Par ailleurs, concernant le gène *Tyr*, seuls le pool de GR et la Blonde d'Aquitaine ont montré une variation d'expression, respectivement de 22 et 5 fois moins que le calibrateur (GG). En revanche le gène *Trp1* est sous-exprimé 55 fois inférieure et 4 fois inférieure respectivement chez le pool de GR et la race Charolaise. De plus, l'analyse d'expression de ce gène a montré une absence de transcrits chez les races Limousine (Ct= 40), Salers (Ct= 40) et Blonde d'Aquitaine (Ct= 40). La valeur (Ct = 40) dans le cas d'absence de transcrits est choisie arbitrairement par le logiciel. De même, l'expression du gène *Trp2* présente une même tendance pour l'ensemble des animaux à « robe rouge ». Comme il a été décrit, *Trp2* est sous-exprimé dans le pool GR (expression 12 fois inférieure). De la même manière, *Trp2* a montré une sous-expression dans l'ensemble des races à « robe rouge ». Les races Limousine, Salers, Blonde d'Aquitaine et Charolaise présentent respectivement 16 - 18 - 16 et 9 fois moins d'ARNm de *Trp2* que dans le pool de GG.





**Figure 42 : niveau d'expression des gènes de la coloration** du pool gris (GG) par rapport à la référence Holstein noire. Une variation significative en dehors de la zone hachurée correspond à une valeur en dessous de 0,5 (sous-expression) ou en dessus de 2 (surexpression). Les histogrammes de la référence Holstein noire correspondent à la valeur 1. Ils n'apparaissent pas sur le graphe.



**Zone de variation non significative**

### III.4.3 Variations d'expression entre le pool de Gasconnes grises et la race Holstein noire

Suite aux variations observées entre le pool gris et le groupe rouge pour les gènes *Mc1r*, *Silver*, *Trp1* et *Trp2*, nous avons étudié le niveau d'expression de l'ensemble des gènes, dans le « pool gris » par rapport à la valeur moyenne d'expression de deux échantillons de peau provenant de la zone noire de la race Holstein (2 animaux) comme référence et dénommés par la suite « Holstein noire ».

Tout d'abord, là encore le gène de contrôle *TfIIId* n'a montré aucune variation par rapport au gène de référence *Gapdh* pour le « pool gris » et l'« Holstein noire » (Figure 42). De même que dans les analyses précédentes, le gène *Agouti* ne varie pas de manière significative. En revanche, l'ensemble des gènes (*Mc1r*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2*) sont sous-exprimés dans le « pool gris » par rapport à la référence « Holstein noire » respectivement de valeurs 3 - 4 - 4,6 et 2,5 fois.

Concernant le gène *Silver*, cette sous-expression ne peut pas être considérée comme significative du fait de sa valeur pas assez faible (taux relatif d'expression supérieur à 0,5).

### III.4.4 Discussion et perspectives

Chez la souris, il est établi que la couleur du pelage est modulée par le niveau d'expression du gène *Agouti* : une forte ou une faible expression de ce gène conduit respectivement à un pelage jaune (phéomélanine) ou noir (eumélanine) de l'animal (Prota et al., 1995). Par ailleurs, notre équipe a récemment démontré que le gène *Agouti* peut moduler la coloration de la robe chez le bovin (Girardot et al., 2006). En effet, l'intensité de la bringueure qui est définie par le ratio poils noirs/poils rouges, est modulée par le niveau de l'expression du gène *Agouti* chez la race bovine Normande. Cependant, il est à noter que cette expression variable est propre à l'allèle ( $A^{br}$ ) du gène *Agouti* découvert chez cette race.

Dans une première étude semi-quantitative, nous avons analysé le niveau de l'expression du gène *Agouti* entre trois animaux Gascons rouges et ces mêmes animaux devenus gris six mois après la naissance. Nous n'avons observé aucune variation transcriptionnelle de ce gène qui serait associée à une pigmentation des poils et de la peau phéomélanique (veau rouge) ou à une pigmentation des poils gris et de la peau noire (veau gris). Nous avons également entrepris une étude comparative de l'expression du gène *Agouti*

entre ces animaux et ceux d'autres races bovines de couleurs différentes et stables. Quel que soit leur âge et leur couleur de robe, les animaux étudiés présentent le même niveau d'expression du gène *Agouti*. Ainsi, et en dépit du rôle avéré du gène *Agouti* dans la synthèse des phéomélanines (pigments rouges) chez la souris et dans une certaine mesure chez la race bovine Normande (Girardot et al., 2006), l'ensemble de ces résultats suggèrent que le changement de couleur chez la race Gasconne se fait indépendamment de l'expression de ce gène. Par ailleurs, le niveau d'expression du gène *Agouti* ne semble pas non plus jouer un rôle majeur dans la définition de la couleur de la robe des autres races étudiées (Limousine, Salers, Blonde d'Aquitaine et Charolaise).

A la suite de ce résultat, nous avons étudié d'autres gènes de coloration dont l'expression est en partie modulée par le niveau d'expression d'*Agouti* chez la souris. Bien que le niveau d'ARNm d'*Agouti* soit le même entre les pools « rouge » et « gris », ce dernier présente une surexpression du gène *Mc1r*, accompagnée d'une surexpression des gènes *Silver*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2*. Ce résultat concorde avec les données acquises chez la souris. En effet, ces gènes de la mélanogénèse sont surexprimés lors de la synthèse de l'eumélanine conduisant à une coloration noire des poils. Néanmoins, la surexpression de la plupart de ces gènes et des autres gènes de la mélanogénèse dépend du niveau d'expression de *Mc1r* et de la modulation de l'activité de son produit par l'hormone  $\alpha$ -MSH, et par la protéine *Agouti*. Ainsi, l'apparition d'une pigmentation noire des poils au cours du changement de couleur rouge/gris du veau chez la Gasconne est corrélée à une surexpression de gènes de la mélanogénèse, mais contrairement à la souris, cette surexpression se fait indépendamment du niveau d'expression d'*Agouti*.

La corrélation entre la surexpression des gènes étudiés de la mélanogénèse et la synthèse de l'eumélanine est particulièrement marquée au niveau des taches noires de la race Holstein qui présente une pigmentation noire des poils et de la peau. La différence d'expression observée entre la Holstein et le Gascon gris s'expliquerait seulement par le fait que, pour ce dernier, les follicules pileux de nombreux poils sont dépourvus de mélanocytes et, par conséquent, de toute activité mélanogénique ; ils sont blancs. La peau chez le Gascon est d'une même pigmentation noire que la Holstein.

Les données relatives au changement de couleur chez la race Gasconne dont nous disposons aujourd'hui, mais également celles récemment acquises chez la souris, montrent à l'évidence que notre hypothèse impliquant le gène *Agouti* dans ce processus était erronée. La surexpression des gènes de la mélanogénèse étudiés, pourrait s'expliquer par une expression

variable du gène *Mitf* et/ou une activité variable de son produit Mitf-M, un facteur de transcription spécifique aux mélanocytes.

Mitf est responsable de l'activation de la plupart des gènes de la mélanogénèse y compris *Mc1r* qu'il active par un mécanisme de feed-back positif. En effet, *Mitf* est activé par la voie de transduction du signal *Mc1r*, mais aussi par différentes voies de signalisation (§. I.2). Mitf-M interagit avec des éléments en *cis*, nommés M-Box, situés dans la région promotrice de gènes de la mélanogénèse incluant *Mc1r*, *Silver*, *Tyr*, *Trp1*, *Trp2* et induit leur expression (Du et al., 2000 ; Steingrimsson et al., 2004).

A)



B)



C)



**Figure 43 : effets différents de trois mutations *brownish*, *White* et *vitiligo* sur le phénotype de couleur du pelage.** A) Trois souris, noire (à gauche), brune (au milieu) et entièrement blanche (à droite) de génotypes respectifs *Mitf*<sup>+/+</sup>, *Mitf*<sup>Mi-b/+</sup> et *Mitf*<sup>Mi-b/Mi-b</sup>. B)

Deux souris, une grise à gauche *Mitf*<sup>Mi-Wh/+</sup> et une autre blanche à droite *Mitf*<sup>Mi-Wh/Mi-Wh</sup>. C) Une souris *Mitf*<sup>vit/vit</sup> à

pelage dilué par rapport à la sauvage est entachée de régions blanches. *Mi-b* désigne l'allèle *brownish*, *Mi-Wh* l'allèle *White*, *Mi-vit* l'allèle *vitiligo* et + l'allèle sauvage. A l'âge adulte, la souris vitiligo jeune devient entièrement blanche. (Steingrimsson et al., 2004)

(<http://www.espcr.org/micemut/locusmitf.html>)

En plus de son rôle déterminant dans l'activation des gènes de la mélanogénèse, l'expression de *Mitf* est indispensable au développement et à la différenciation du mélanocyte. Selon la sévérité des mutations, les allèles de *Mitf* conduisent à un pelage entaché de régions blanches, un pelage entièrement blanc ou dilué (Figure 43) qui reflète l'absence des mélanocytes au niveau des follicules pileux (Steingrimsson et al., 2004). Ainsi, il est tout à fait possible que le même gène, en l'occurrence *Mitf*, soit responsable du changement de couleur rouge au gris chez la race Gasconne. En effet, il assure un rôle majeur aussi bien dans la stimulation de l'eumélanogénèse (pigment noir) que dans la différenciation et le développement des mélanocytes. Avec un tel rôle, on peut raisonnablement supposer une

forte expression de *Mitf* au niveau de certains follicules pileux (poils noirs) et une baisse, voire une absence de son expression aux niveaux des autres (poils blancs). Un des mécanismes qui peut doter *Mitf* d'une telle expression chez la race Gasconne serait une régulation épigénétique de son expression. Cette hypothèse reste à vérifier.

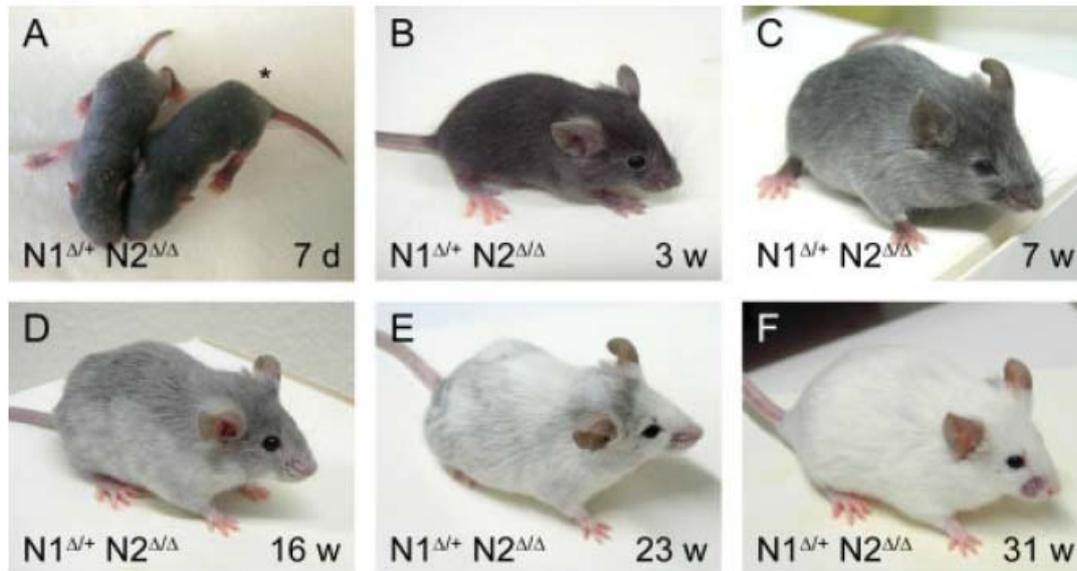
Quel que soit le facteur impliqué dans ce changement de couleur chez la race bovine Gasconne, il est de plus en plus clair aujourd'hui que ce facteur est un élément parmi ceux impliqués directement ou non dans le développement des mélanocytes.

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 ils dérivent sous forme de mélanoblastes (cellules non-pigmentées) dès les premiers stades du développement embryonnaire. Il est à noter que les mélanocytes colonisent l'épiderme avant la différenciation des poils. Ainsi, pendant la vie embryonnaire, ce sont les mélanocytes épidermiques qui sont à l'origine de la première pigmentation des poils. En effet, dans les follicules pileux, la population des mélanocytes bulbaires est renouvelée à chaque cycle et, par conséquent, l'activité des mélanocytes folliculaires est discontinue, rythmée par le cycle pileux.

L'existence d'un réservoir de mélanocytes dans les follicules pileux des mammifères a été proposée (Sugiyama et Kukita, 1976). Aujourd'hui, différents travaux mettent en évidence 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. En effet, lors du développement embryonnaire, une fois au niveau du follicule pileux, les mélanoblastes se scindent en deux populations : les mélanocytes différenciés qui colonisent la matrice du poil et qui entament la synthèse des mélanines 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 proviennent directement des mélanoblastes et ne passent pas par le stade des cellules souches mélanocytaires (Mak et *al.*, 2006).

Récemment, d'excellents travaux (Schouwey et *al.*, 2007 ; Aubin-Houzelstein et *al.*, 2008) soulignent l'importance des voies de transduction de Notch (*Notch1* et *Notch2*) dans la différenciation et le renouvellement des mélanocytes à chaque cycle pileux. Ces auteurs ont pu montrer entre autres, 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 (melanocyte stem cells) du bulge est dose-dépendant de la voie *Notch1/Notch2* (Figure 44). 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).



**Figure 44 : les images illustrent l'importance des voies Notch dans le renouvellement des mélanocytes à partir des cellules souches au niveau du bulge.** A) L'animal naît avec une pigmentation normale (le sauvage est marqué par une étoile). B à F : à partir de 3 semaines, le pelage gris de la souris invalidée 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).

Ces données récemment acquises chez la souris suggèrent que la voie Notch ou l'une de ses cibles pourraient expliquer le grisonnement avec l'âge, observé chez la race bovine Gasconne. Néanmoins, chez ces souris, il s'agit d'un grisonnement du pelage avec l'âge, alors que, chez la Gasconne, on assiste en plus à un changement de couleur.

Le facteur *Mitf* régule l'expression des gènes impliqués dans la voie de différenciation des mélanocytes (*Tyr*, *Mcl1*, *Silver*, etc) et la voie anti-apoptotique (*Bcl2*) semble être le candidat (Levy et al., 2006).



### III.5 Conclusion générale

L'énorme diversité des patrons de coloration est probablement la manifestation la plus remarquable des relations complexes entre les facteurs environnementaux, les voies de transduction du signal, et les facteurs de transcription participant à la genèse et à la différenciation d'une lignée cellulaire.

Les conséquences visibles des mutations affectant la lignée mélanocytaire ont permis d'estimer à plus de 100, le nombre de gènes impliqués dans la définition de la coloration chez la souris. Près d'un tiers de ces gènes ont été clonés et ne codent pas seulement des protéines nécessaires à la synthèse des mélanines et à la fonction du mélanosome, mais codent aussi des molécules de signalisation et des facteurs de transcription jouant un rôle critique dans le développement de la lignée mélanocytaire. L'analyse moléculaire des mutants murins a permis de déterminer la structure des gènes et la fonction de leurs produits. Mais au-delà, elle constitue une véritable banque de données génétiques pour la compréhension des modifications qui sous-tendent les patrons de coloration d'autres espèces, telle que l'espèce bovine.

Le travail présenté dans ce mémoire comporte deux volets : le premier consiste à obtenir des preuves fonctionnelles relatives aux allèles du gène *Silver/Pme17* impliqué dans la biogenèse du mélanosome, le second à une contribution à l'identification des bases moléculaires qui régissent le changement de couleur qui caractérise certaines races bovines comme la Gasconne.

L'approche souris était pour nous une démarche concluante pour le premier volet. Nous avons tenté d'exprimer les deux allèles du gène *Silver/Pme17* bovin par recombinaison homologue. Après une période nécessaire à la réalisation des constructions géniques requises pour un tel travail, nous avons criblé 800 clones de cellules recombinantes. Malheureusement, le clone désiré n'a pas été identifié. Pour pallier ce résultat, nous avons entrepris une approche *in vitro*. Les résultats, qui restent néanmoins à confirmer, suggèrent que les allèles *Silver/Pme17* identifiés affecteraient l'élimination du peptide signal, ce qui engendrerait un blocage de *Pme17* au niveau de l'une des étapes de sa maturation. Cette maturation inachevée de *Pme17* serait responsable du blocage des mélanosomes au stade I chez la race Charolaise.

Le deuxième volet de ce mémoire a montré que le changement de couleur de la race Gasconne s'effectue indépendamment du niveau d'expression du gène *Agouti*. Par ailleurs,

nous avons également montré que toutes les races bovines étudiées présentent le même niveau d'expression de ce gène.

Bien que l'expression du gène *Agouti* ne varie pas, le changement de couleur chez la race Gasconne s'accompagne d'une surexpression de gènes de coloration étudiés chez l'animal adulte. Ce phénomène consiste à la fois en un grisonnement de la robe (poils noirs/blancs) en fonction de l'âge et en un changement de couleur (veau né rouge).

Le gène candidat qui expliquerait ce processus chez la Gasconne est le gène *Mitf* de part son implication dans l'expression de la plupart des gènes de coloration et du développement des mélanocytes.

## Références bibliographiques

- Aarts, M., Dekker, M., de Vries, S., van der Wal, A., and te Riele, H. (2006). Generation of a mouse mutant by oligonucleotide-mediated gene modification in ES cells. *Nucleic Acids Res* 34, e147.
- Abdel-Malek, Z., Scott, M. C., Suzuki, I., Tada, A., Im, S., Lamoreux, L., Ito, S., Barsh, G., and Hearing, V. J. (2000). The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8, 156-162.
- Abdel-Malek, Z., Suzuki, I., Tada, A., Im, S., and Akcali, C. (1999). The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* 885, 117-133.
- Adalsteinsson, S., Bjarnadottir, S., Vage, D. I., and Jonmundsson, J. V. (1995). Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. *J Hered* 86, 395-398.
- Adema, G. J., de Boer, A. J., Vogel, A. M., Loenen, W. A., and Figdor, C. G. (1994). Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J Biol Chem* 269, 20126-20133.
- Allison, D. S., and Young, E. T. (1989). Mutations in the signal sequence of prepro-alpha-factor inhibit both translocation into the endoplasmic reticulum and processing by signal peptidase in yeast cells. *Mol Cell Biol* 9, 4977-4985.
- Anderson, D. E. (1991). Genetic study of eye cancer in cattle. *J Hered* 82, 21-26.
- Aubin-Houzelstein, Djian-Zaouche J, Bernex F, Gadin S, Delmas V, Larue L, Panthier JJ. (2008). Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *J Invest Dermatol*. 128(11):2686-95.
- Bailin, T., Lee, S. T., and Spritz, R. A. (1996). Genomic organization and sequence of D12S53E (Pmel 17), the human homologue of the mouse silver (si) locus. *J Invest Dermatol* 106, 24-27.
- Basrur, V., Yang, F., Kushimoto, T., Higashimoto, Y., Yasumoto, K., Valencia, J., Muller, J., Vieira, W. D., Watabe, H., Shabanowitz, J., et al. (2003). Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res* 2, 69-79.
- Baxter, L. L., and Pavan, W. J. (2003). Pmel17 expression is Mitf-dependent and reveals cranial melanoblast migration during murine development. *Gene Expr Patterns* 3, 703-707.
- Becerril, C. M., Wilcox, C. J., Lawlor, T. J., Wiggins, G. R., and Webb, D. W. (1993). Effects of percentage of white coat colour on Holstein production and reproduction in a subtropical environment. *Journal of Dairy Science* 76, 2286-2291.
- Bennett, D. C., and Lamoreux, M. L. (2003). The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* 16, 333-344.

- Berens, W., Van Den Bossche, K., Yoon, T. J., Westbroek, W., Valencia, J. C., Out, C. J., Marie Naeyaert, J., Hearing, V. J., and Lambert, J. (2005). Different approaches for assaying melanosome transfer. *Pigment Cell Res* 18, 370-381.
- Berge, S. (1961). Influence of dun on brown and brindle cattle. *Zeitschrift für Tierzucht und Züchtungsbiologie* 75, 298.
- Berryere, T. G., Schmutz, S. M., Schimpf, R. J., Cowan, C. M., and Potter, J. (2003). TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Anim Genet* 34, 169-175.
- Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 12, 3451-3464.
- Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S. (2003). Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* 161, 521-533.
- Biet, E., Larue, L., Dutreix, M. (2003). Recombinaison homologue et ciblage de gène. *C R Biol* 326(1), 51-64.
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D. E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M., and Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 1907-1917.
- Briquet, R., JR., and Lush, J. L. (1947). Heritability of amount of spotting in Holstein-Friesian cattle. *J Hered* 38, 99-105.
- Brunberg, E., Andersson, L., Cothran, G., Sandberg, K., Mikko, S., and Lindgren, G. (2006). A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet* 7, 46.
- Cardinali, G., Bolasco, G., Aspite, N., Lucania, G., Lotti, L. V., Torrisi, M. R., and Picardo, M. (2008). Melanosome transfer promoted by keratinocyte growth factor in light and dark skin-derived keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128, 558-567.
- Charlier, C., Denys, B., Belanche, J. I., Coppieters, W., Grobet, L., Mni, M., Womack, J., Hanset, R., and Georges, M. (1996). Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer disease. *Mamm Genome* 7, 138-142.
- Chhajlani, V., and Wikberg, J. E. (1992). Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309, 417-420.
- Choi, J. W., Lee, E. Y., Shin, J. H., Zheng, Y., Cho, B. W., Kim, J. K., Kim, H., and Han, J. Y. (2007). Identification of breed-specific DNA polymorphisms for a simple and unambiguous screening system in germline chimeric chickens. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 307, 241-248.

- Clark, L. A., Wahl, J. M., Rees, C. A., and Murphy, K. E. (2006). Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1376-1381.
- Cole, L. J., Van Lone, E. E., and Johansson, I. (1934). Albinotec dilution of color in cattle. *J Hered* 25, 145-156.
- Cordaux, R., and Batzer, M. A. (2006). Teaching an old dog new tricks: SINEs of canine genomic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1157-1158.
- De Matteis, M. A., and Morrow, J. S. (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113 ( Pt 13), 2331-2343.
- De Maziere, A. M., Muehlethaler, K., van Donselaar, E., Salvi, S., Davoust, J., Cerottini, J. C., Levy, F., Slot, J. W., and Rimoldi, D. (2002). The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic* 3, 678-693.
- Dekker, M., Brouwers, C., and te Riele, H. (2003). Targeted gene modification in mismatch-repair-deficient embryonic stem cells by single-stranded DNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 31, e27.
- Deng, C., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1993). Location of crossovers during gene targeting with insertion and replacement vectors. *Mol Cell Biol* 13, 2134-2140.
- Du, J., Miller, A. J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., and Fisher, D. E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 163, 333-343.
- Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., Nishimura, E. K., Golub, T. R., and Fisher, D. E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 6, 565-576.
- Dunn, L. C. (1937). Studies on Spotting Patterns II. Genetic Analysis of Variegated Spotting in the House Mouse. *Genetics* 22 (1), 43-64.
- Dunn, L. C., and Thigpen, L. W. (1930). The silver mouse. A recessive color variation. *Journal of Heredity* 21, 495-498.
- Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 4, e6.
- Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 32, 217-224.
- Girardot, M., Guibert, S., Laforet, M. P., Gallard, Y., Larroque, H., and Oulmouden, A. (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.

- Girardot, M., Martin, J., Guibert, S., Leveziel, H., Julien, R., and Oulmouden, A. (2005). Widespread expression of the bovine Agouti gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res* 18, 34-41.
- Giuffra, E., Evans, G., Tornsten, A., Wales, R., Day, A., Looft, H., Plastow, G., and Andersson, L. (1999). The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant white (I/KIT) locus. *Mamm Genome* 10, 1132-1136.
- Goder, V., and Spiess, M. (2003). Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 22, 3645-3653.
- Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Devarajan, P., Stabach, P. R., Morrow, J. S., Di Tullio, G., Polishchuk, R., Petrucci, T. C., Luini, A., and De Matteis, M. A. (1998). ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8607-8612.
- Goding, C. (2005). Editorial: a model, MIA and Sox. *Pigment Cell Res* 18, 63.
- Graphodatskaya, D., Joerg, H., and Stranzinger, G. (2002). Molecular and pharmacological characterisation of the MSH-R alleles in Swiss cattle breeds. *J Recept Signal Transduct Res* 22, 421-430.
- Grosz, M. D., and MacNeil, M. D. (1999). The "spotted" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-Cross population. *J Hered* 90, 233-236.
- Gutierrez-Gil, B., Wiener, P., and Williams, J. L. (2007). Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais x Holstein population. *BMC Genet* 8, 56.
- Hagedoorn, A. L. (1912). The genetic factors in the development of the house mouse which influence coat color. *Z induct Abstamm-u VererbLehre* 6, 97-136.
- Harper, D. C., Theos, A. C., Herman, K. E., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S. (2008). Premelanosome amyloid-like fibrils are composed of only golgi-processed forms of Pmel17 that have been proteolytically processed in endosomes. *J Biol Chem* 283, 2307-2322.
- Hearing, V. J. (2007). Regulating melanosome transfer: who's driving the bus? *Pigment Cell Res* 20, 334-335.
- Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (2000). The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* 102, 233-244.
- Herzog, V., Kirfel, G., Siemes, C., and Schmitz, A. (2004). Biological roles of APP in the epidermis. *Eur J Cell Biol* 83, 613-624.
- Hirobe, T., and Abe, H. (2007a). Excess tyrosine restores the morphology and maturation of melanosomes affected by the murine slaty mutation. *Zoolog Sci* 24, 338-345.

- Hirobe, T., and Abe, H. (2007b). Changes of melanosome morphology associated with the differentiation of epidermal melanocytes in slaty mice. *Anat Rec (Hoboken)* 290, 981-993.
- Hirobe, T., Abe, H., Wakamatsu, K., Ito, S., Kawa, Y., Soma, Y., and Mizoguchi, M. (2007c). Excess tyrosine rescues the reduced activity of proliferation and differentiation of cultured recessive yellow melanocytes derived from neonatal mouse epidermis. *Eur J Cell Biol* 86, 315-330.
- Hirobe, T., and Ootaka, H. (2007d). Interleukin-1 $\alpha$  stimulates the differentiation of melanocytes but inhibits the proliferation of melanoblasts from neonatal mouse epidermis. *Zoolog Sci* 24, 959-970.
- Hoashi, T., Muller, J., Vieira, W. D., Rouzaud, F., Kikuchi, K., Tamaki, K., and Hearing, V. J. (2006). The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. *J Biol Chem* 281, 21198-21208.
- Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W. D., and Hearing, V. J. (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.
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- Huber, W. E., Price, E. R., Widlund, H. R., Du, J., Davis, I. J., Wegner, M., and Fisher, D. E. (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.
- Huff, M. E., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2003). Pathological and functional amyloid formation orchestrated by the secretory pathway. *Curr Opin Struct Biol* 13, 674-682.
- Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R., and Seabra, M. C. (2001). Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152, 795-808.
- Hume, A. N., Ushakov, D. S., Tarafder, A. K., Ferenczi, M. A., and Seabra, M. C. (2007). Rab27a and MyoVa are the primary Mlph interactors regulating melanosome transport in melanocytes. *J Cell Sci* 120, 3111-3122.
- Jackson, I. J. (1994). Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet* 28, 189-217.
- Jiao, Z., Zhang, Z. G., Hornyak, T. J., Hozeska, A., Zhang, R. L., Wang, Y., Wang, L., Roberts, C., Strickland, F. M., and Chopp, M. (2006). Dopachrome tautomerase (Dct) regulates neural progenitor cell proliferation. *Dev Biol* 296, 396-408.

- Joerg, H., Fries, H. R., Meijerink, E., and Stranzinger, G. F. (1996). Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm Genome* 7, 317-318.
- Jolly, R. D., Wills, J. L., Kenny, J. E., Cahill, J. I., and Howe, L. (2008). Coat-colour dilution and hypotrichosis in Hereford crossbred calves. *N Z Vet J* 56, 74-77.
- Jones, B. H., Kim, J. H., Zemel, M. B., Woychik, R. P., Michaud, E. J., Wilkison, W. O., and Moustaid, N. (1996). Upregulation of adipocyte metabolism by agouti protein: possible paracrine actions in yellow mouse obesity. *Am J Physiol* 270, E192-196.
- Kawakami, A., Sakane, F., Imai, S., Yasuda, S., Kai, M., Kanoh, H., Jin, H. Y., Hirosaki, K., Yamashita, T., Fisher, D. E., and Jimbow, K. (2008). Rab7 regulates maturation of melanosomal matrix protein gp100/Pmel17/Silv. *J Invest Dermatol* 128, 143-150.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3515-3519.
- Kerje, S., Sharma, P., Gunnarsson, U., Kim, H., Bagchi, S., Fredriksson, R., Schutz, K., Jensen, P., von Heijne, G., Okimoto, R., and Andersson, L. (2004). The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the PMEL17 gene. *Genetics* 168, 1507-1518.
- Kim, K. K., Youn, B. S., Heng, H. H., Shi, X. M., Tsui, L. C., Lee, Z. H., Pickard, R. T., and Kwon, B. S. (1996). Genomic organization and FISH mapping of human Pmel 17, the putative silver locus. *Pigment Cell Res* 9, 42-48.
- Klinckmann, G., Koniszewski, G., and Wegner, W. (1987). [Light microscopy studies of the cornea of Merle dachshunds]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 94, 338-341.
- Klungland, H., Vage, D. I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S., and Lien, S. (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6, 636-639.
- Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jimenez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borrón, J. C., and Hearing, V. J. (1994). Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *Embo J* 13, 5818-5825.
- Kuehn, C., and Weikard, R. (2007). Multiple splice variants within the bovine silver homologue (SILV) gene affecting coat color in cattle indicate a function additional to fibril formation in melanophores. *BMC Genomics* 8, 335.
- Kuhn, C., and Weikard, R. (2007). An investigation into the genetic background of coat colour dilution in a Charolais x German Holstein F2 resource population. *Anim Genet* 38, 109-113.
- Kural, C., Serpinskaya, A. S., Chou, Y. H., Goldman, R. D., Gelfand, V. I., and Selvin, P. R. (2007). Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5378-5382.

- Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W. D., Ferrans, V. J., Muller, J., Appella, E., and Hearing, V. J. (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10698-10703.
- Kwon, B. S., Chintamaneni, C., Kozak, C. A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N., Barton, D., Francke, U., Kobayashi, Y., and Kim, K. K. (1991). A melanocyte-specific gene, *Pmel 17*, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9228-9232.
- Kwon, B. S., Halaban, R., Kim, G. S., Usack, L., Pomerantz, S., and Haq, A. K. (1987). A melanocyte-specific complementary DNA clone whose expression is inducible by melanotropin and isobutylmethyl xanthine. *Mol Biol Med* 4, 339-355.
- Kwon, B. S., Halaban, R., Ponnazhagan, S., Kim, K., Chintamaneni, C., Bennett, D., and Pickard, R. T. (1995). Mouse silver mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of *Pmel 17*. *Nucleic Acids Res* 23, 154-158.
- Lauvergne, J. J. (1966). Génétique de la couleur de pelage des bovins domestiques. *Bibliographia genetica* 20, 1-168.
- Le Borgne, R., Planque, N., Martin, P., Dewitte, F., Saule, S., and Hoflack, B. (2001). The AP-3-dependent targeting of the melanosomal glycoprotein QNR-71 requires a di-leucine-based sorting signal. *J Cell Sci* 114, 2831-2841.
- Lee, Z. H., Hou, L., Moellmann, G., Kuklinska, E., Antol, K., Fraser, M., Halaban, R., and Kwon, B. S. (1996). Characterization and subcellular localization of human *Pmel 17/silver*, a 110-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J Invest Dermatol* 106, 605-610.
- Levy, C., Khaled, M., Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12(9), 406-414.
- Locke, M. M., Penedo, M. C., Bricker, S. J., Millon, L. V., and Murray, J. D. (2002). Linkage of the grey coat colour locus to microsatellites on horse chromosome 25. *Anim Genet* 33, 329-337.
- Lopes, V. S., Wasmeier, C., Seabra, M. C., and Futter, C. E. (2007). Melanosome maturation defect in Rab38-deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. *Mol Biol Cell* 18, 3914-3927.
- Majeskie, J. L. (1970). Characteristics and inheritance of certain coat colours and patterns in cattle. PhD thesis, Kansas state university, Manhattan, Kansas.
- 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.

- Maresh, G. A., Marken, J. S., Neubauer, M., Aruffo, A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., and Marquardt, H. (1994a). Cloning and expression of the gene for the melanoma-associated ME20 antigen. *DNA Cell Biol* 13, 87-95.
- Maresh, G. A., Wang, W. C., Beam, K. S., Malacko, A. R., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., and Marquardt, H. (1994b). Differential processing and secretion of the melanoma-associated ME20 antigen. *Arch Biochem Biophys* 311, 95-102.
- Marks, M. S., and Seabra, M. C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 738-748.
- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Bennett, D. C., Lozano, J. A., Solano, F., and Garcia-Borron, J. C. (1999). The mouse silver locus encodes a single transcript truncated by the silver mutation. *Mamm Genome* 10, 1168-1171.
- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A., and Garcia-Borron, J. C. (2000). Regulation of the murine silver locus product (gp87) by the hypopigmenting cytokines TGF-beta1 and TNF-alpha. *Pigment Cell Res* 13, 120-126.
- Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 349, 709-713.
- Miller, A. J., Levy, C., Davis, I. J., Razin, E., and Fisher, D. E. (2005). Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFE8. *J Biol Chem* 280, 146-155.
- Minwalla, L., Zhao, Y., Cornelius, J., Babcock, G. F., Wickett, R. R., Le Poole, I. C., and Boissy, R. E. (2001). Inhibition of melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes by lectins and neoglycoproteins in an in vitro model system. *Pigment Cell Res* 14, 185-194.
- Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, 523-533.
- Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T., and Cone, R. D. (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257, 1248-1251.
- Natt, D., Kerje, S., Andersson, L., and Jensen, P. (2007). Plumage color and feather pecking--behavioral differences associated with PMEL17 genotypes in chicken (*Gallus gallus*). *Behav Genet* 37, 399-407.
- Nichols, S. E., Harper, D. C., Berson, J. F., and Marks, M. S. (2003). A novel splice variant of Pmel17 expressed by human melanocytes and melanoma cells lacking some of the internal repeats. *J Invest Dermatol* 121, 821-830.
- Nishimura, E. K., Jordan, S. A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I. J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416, 854-860.

- Nishimura, E. K., Granter, S. R., and Fisher, D. E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307, 720-724.
- Olson (1980). Choice of a wild-type standard in colour genetics of domestic cattle. *Journal of Heredity* 71, 442-444.
- Olson (1999). Genetics of colour variation. CAB International, 33-51.
- Olson, T. A. (1975). An analysis of the inheritance of coat colour in cattle. MS thesis, Iowa State University, Ames.
- Olson, T. A. a. W., R.L. (1982). Inheritance of coat colour in cattle. Iowa State University and Agricultural Experiment Station Bulletin 595.
- O'Sullivan, T. N., Wu, X. S., Rachel, R. A., Huang, J. D., Swing, D. A., Matesic, L. E., Hammer, J. A., 3rd, Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2004). dsu functions in a MYO5A-independent pathway to suppress the coat color of dilute mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16831-16836.
- Oulmouden, A. Julien, R., Laforêt, M. P., Leveziel, H. Use of silver gene for authentication of the racial origin of animal populations, and of the derivative products thereof. WO2005/019473.
- Paine, C., Sharlow, E., Liebel, F., Eisinger, M., Shapiro, S., and Seiberg, M. (2001). An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway. *J Invest Dermatol* 116, 587-595.
- Petersen, W. E., Gilmore, L. O., Fitch, J. B., and Winters, L. M. (1944). Albinism in cattle. *J Hered* 35, 135-144.
- Planque, N., Turque, N., Opdecamp, K., Bailly, M., Martin, P., and Saule, S. (1999). Expression of the microphthalmia-associated basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor Mi in avian neuroretina cells induces a pigmented phenotype. *Cell Growth Differ* 10, 525-536.
- Potterf, S. B., and Hearing, V. J. (1998). Tyrosine transport into melanosomes is increased following stimulation of melanocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 795-800.
- Price, E. R., Horstmann, M. A., Wells, A. G., Weilbaecher, K. N., Takemoto, C. M., Landis, M. W., and Fisher, D. E. (1998). alpha-Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem* 273, 33042-33047.
- Prota, G., Lamoreux, M. L., Muller, J., Kobayashi, T., Napolitano, A., Vincensi, M. R., Sakai, C., and Hearing, V. J. (1995). Comparative analysis of melanins and melanosomes produced by various coat color mutants. *Pigment Cell Res* 8, 153-163.

- Quast, T., Wehner, S., Kirfel, G., Jaeger, K., De Luca, M., and Herzog, V. (2003). sAPP as a regulator of dendrite motility and melanin release in epidermal melanocytes and melanoma cells. *Faseb J* 17, 1739-1741.
- Quevedo, W. J., Fleischmann, RD, Dyckman, J (1981). Premature loss of melanocytes from hair follicles of light (BI) and silver (si) mice. *Pigment Cell Phenotypic Expression in Pigment Cells* University of Tokyo Press, Tokyo, pp 177–183.
- Reetz, I., Stecker, M., and Wegner, W. (1977). [Audiometric findings in dachshunds (merle gene carriers)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 84, 273-277.
- Reinsch, N., Thomsen, H., Xu, N., Brink, M., Looft, C., Kalm, E., Brockmann, G. A., Grupe, S., Kuhn, C., Schwerin, M., et al. (1999). A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. *J Hered* 90, 629-634.
- Renieri, C., Ceccarelli, P., Gargiulo, A. M., Lauvergne, J. J., and Monacelli, G. (1993). Chemical and electron microscopic studies of cattle (*Bos taurus*) with four types of phenotypic pigmentation. *Pigment Cell Res* 6, 165-170.
- Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. G., and Cone, R. D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.
- Rosch, K., Naeher, D., Laird, V., Goder, V., and Spiess, M. (2000). The topogenic contribution of uncharged amino acids on signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 14916-14922.
- Rougeot, J. (1981). Déterminisme de la répartition de la pigmentation dans le pelage et la peau des Mammifères. *Genetics Selection Evolution* 13, 9-16.
- Rouzaud, F., Martin, J., Gallet, P. F., Delourme, D., Goulemot-Leger, V., Amigues, Y., Menissier, F., Leveziel, H., Julien, R., and Oulmouden, A. (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.
- Russo, V., and Fontanesi, L. (2004). Coat colour gene analysis breed traceability. *Bruna* 3, 95–100.
- Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G. J., Goodall, J., Hallsson, J. H., Goding, C. R., Steingrímsson, E., and Hecht, A. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Mol Cell Biol* 26, 8914-8927.
- Schmidtz, B. H., Buchanan, F. C., Plante, Y., and Schmutz, S. M. (2001). Linkage mapping of the tyrosinase gene to bovine chromosome 29. *Anim Genet* 32, 119-120.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ciobanu, D. C., Mileham, A. J., Schmidtz, B. H., and Fredholm, M. (2004). A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm Genome* 15, 62-67.

- Schonthaler, H. B., Lampert, J. M., von Lintig, J., Schwarz, H., Geisler, R., and Neuhauss, S. C. (2005). A mutation in the silver gene leads to defects in melanosome biogenesis and alterations in the visual system in the zebrafish mutant fading vision. *Dev Biol* 284, 421-436.
- Schouwey, K., Delmas, V., Larue, L., Zimber-Strobl, U., Strobl, L. J., Radtke, F., and Beermann, F. (2007). Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. *Dev Dyn* 236, 282-289.
- Scott, G., Deng, A., Rodriguez-Burford, C., Seiberg, M., Han, R., Babiarz, L., Grizzle, W., Bell, W., and Pentland, A. (2001a). 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., Leopardi, S., Printup, S., and Madden, B. C. (2002). Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci* 115, 1441-1451.
- Scott, G., Leopardi, S., Printup, S., Malhi, N., Seiberg, M., and Lapoint, R. (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.
- Scott, G., and Zhao, Q. (2001b). Rab3a and SNARE proteins: potential regulators of melanosome movement. *J Invest Dermatol* 116, 296-304.
- Searle, A. (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., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., and Shapiro, S. S. (2000). The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 254, 25-32.
- Seiji, M., and Iwashita, S. (1963). On the Site of Melanin Formation in Melanocytes. *J Biochem* 54, 465-467.
- Seo, K., Mohanty, T. R., Choi, T., and Hwang, I. (2007). Biology of epidermal and hair pigmentation in cattle: a mini-review. *Vet Dermatol* 18, 392-400.
- Siegrist, W., Drozd, R., Cotti, R., Willard, D. H., Wilkison, W. O., and Eberle, A. N. (1997). Interactions of alpha-melanotropin and agouti on B16 melanoma cells: evidence for inverse agonism of agouti. *J Recept Signal Transduct Res* 17, 75-98.
- Silver, L. M. (1995). *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press. (<http://www.informatics.jax.org/silverbook/index.shtml>)
- Silvers, W. K. (1979). *The coat colors of mice: A model for mammalian gene action and interaction*. Springer-Verlag, New York.

- Singh, S. K., Nizard, C., Kurfurst, R., Bonte, F., Schnebert, S., and Tobin, D. J. (2008). The silver locus product (Silv/gp100/Pmel17) as a new tool for the analysis of melanosome transfer in human melanocyte-keratinocyte co-culture. *Exp Dermatol* 17, 418-426.
- Solano, F., Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Hill, S. P., Lozano, J. A., and Garcia-Borron, J. C. (2000). New insights on the structure of the mouse silver locus and on the function of the silver protein. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8, 118-124.
- Spanakis, E., Lamina, P., and Bennett, D. C. (1992). Effects of the developmental colour mutations silver and recessive spotting on proliferation of diploid and immortal mouse melanocytes in culture. *Development* 114, 675-680.
- Steingrimsson, E., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38, 365-411.
- Steingrimsson, E., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2005). Melanocyte stem cell maintenance and hair graying. *Cell* 121, 9-12.
- Stennett, L. S., Riker, A. I., Kroll, T. M., Chamberlin, J., Miki, T., Nickoloff, B. J., and Le Poole, I. C. (2004). Expression of gp100 and CDK2 in melanoma cells is not co-regulated by a shared promoter region. *Pigment Cell Res* 17, 525-532.
- 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.
- Suzuki, I., Cone, R. D., Im, S., Nordlund, J., and Abdel-Malek, Z. A. (1996). Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 137, 1627-1633.
- Suzuki, I., Tada, A., Ollmann, M. M., Barsh, G. S., Im, S., Lamoreux, M. L., Hearing, V. J., Nordlund, J. J., and Abdel-Malek, Z. A. (1997). Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol* 108, 838-842.
- Tachibana, M., Takeda, K., Nobukuni, Y., Urabe, K., Long, J. E., Meyers, K. A., Aaronson, S. A., and Miki, T. (1996). Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet* 14, 50-54.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2000). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem* 275, 14013-14016.
- Tassabehji, M., Newton, V. E., and Read, A. P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet* 8, 251-255.
- Theos, A. C., Berson, J. F., Theos, S. C., Herman, K. E., Harper, D. C., Tenza, D., Sviderskaya, E. V., Lamoreux, M. L., Bennett, D. C., Raposo, G., and Marks, M. S. (2006a). Dual loss of ER export and endocytic signals with altered melanosome morphology in the silver mutation of Pmel17. *Mol Biol Cell* 17, 3598-3612.

- Theos, A. C., Truschel, S. T., Raposo, G., and Marks, M. S. (2005). The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res* 18, 322-336.
- Theos, A. C., Truschel, S. T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D. C., Berson, J. F., Thomas, P. C., Raposo, G., and Marks, M. S. (2006b). A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell* 10, 343-354.
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Tsukamoto, K., Palumbo, A., D'Ischia, M., Hearing, V. J., and Prota, G. (1992). 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid is incorporated in mammalian melanin. *Biochem J* 286 (Pt 2), 491-495.
- Valencia, J. C., Hoashi, T., Pawelek, J. M., Solano, F., and Hearing, V. J. (2006a). Pmel17: controversial indeed but critical to melanocyte function. *Pigment Cell Res* 19, 250-252; author reply 253-257.
- Valencia, J. C., Rouzaud, F., Julien, S., Chen, K. G., Passeron, T., Yamaguchi, Y., Abu-Asab, M., Tsokos, M., Costin, G. E., Yamaguchi, H., et al. (2007). Sialylated core 1 O-glycans influence the sorting of Pmel17/gp100 and determine its capacity to form fibrils. *J Biol Chem* 282, 11266-11280.
- Valencia, J. C., Watabe, H., Chi, A., Rouzaud, F., Chen, K. G., Vieira, W. D., Takahashi, K., Yamaguchi, Y., Berens, W., Nagashima, K., et al. (2006b). Sorting of Pmel17 to melanosomes through the plasma membrane by AP1 and AP2: evidence for the polarized nature of melanocytes. *J Cell Sci* 119, 1080-1091.
- Vallee, R. B., Wall, J. S., Paschal, B. M., and Shpetner, H. S. (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* 332, 561-563.
- Van Den Bossche, K., Naeyaert, J. M., and Lambert, J. (2006). The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7, 769-778.
- Vijayasaradhi, S., Xu, Y., Bouchard, B., and Houghton, A. N. (1995). Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J Cell Biol* 130, 807-820.
- Watabe, H., Valencia, J. C., Le Pape, E., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Rouzaud, F., Hoashi, T., Kawa, Y., Mizoguchi, M., and Hearing, V. J. (2008). Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking. *J Invest Dermatol* 128, 162-174.
- Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet* 18, 283-286.

- Weber, W., and Lauvergne, J. J. (1964). Trois cas d'Albinisme rencontrés en Suisse dans la race Brune des Alpes. *ANN Zootech* 13, 151-154.
- Westerhof, W. (2006). The discovery of the human melanocyte. *Pigment Cell Res* 19, 183-193.
- Wriedt, C. (1925). Colour-sided cattle. *Journal of Heredity* 16, 51-56.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., and Hearing, V. J. (2007). The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 282, 27557-27561.
- Yamaguchi, Y., Hearing, V. J., Itami, S., Yoshikawa, K., and Katayama, I. (2005). Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: aiming for site-specific tissue regeneration. *J Dermatol Sci* 40, 1-9.
- Yasumoto, K., Watabe, H., Valencia, J. C., Kushimoto, T., Kobayashi, T., Appella, E., and Hearing, V. J. (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., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14, 8058-8070.
- Zhang, Z., and Henzel, W. J. (2004). Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. *Protein Sci* 13, 2819-2824.



## **Coloration de la robe chez le bovin. Etudes fonctionnelles des allèles du gène *Silver/Pmel17* bovin et, contribution à l'identification de gènes impliqués dans le changement post-natal de la coloration chez la race Gasconne.**

Le facteur de dilution bien connu des éleveurs et qui caractérise la race bovine charolaise et dans une certaine mesure la race Simmental a été récemment identifié à l'échelle moléculaire par l'UMR1061. Il s'agit de deux allèles *Dc* (dilution Charolaise) et *Ds* (dilution Simmental) qui affectent le peptide signal de la protéine Silver/Pmel17. Cette dernière joue un rôle crucial dans la biogenèse du mélanosome. Dans l'objectif de comprendre le mécanisme de dilution associé à ces deux allèles nous avons entrepris une approche souris et une étude *in vitro*. La richesse en séquences répétées du gène *Silver* murin ne nous a pas permis d'obtenir les souris transgéniques porteuses des mutations identifiées chez le bovin. En revanche, l'approche cellulaire nous a permis de montrer un effet inhibiteur de la mutation *Dc* sur le clivage du peptide signal en N-terminale de la protéine Silver Charolaise. Par ailleurs, l'approche transcriptomique que nous avons menée afin de comprendre le changement post-natal de la couleur de la robe de la race Gasconne révèle que ce dernier s'accompagne d'une surexpression de tous les gènes de coloration étudiés à l'exception du gène *Agouti*. En effet l'expression de ce dernier reste inchangée quelque soit la coloration de la robe.

Mots clés : Silver, Charolaise, Gasconne, couleur de la robe, mélanocyte, mélanine, peptide signal, souris.

## **Cattle coat colour. Functional studies of the *Silver/Pmel17* alleles and contribution to the identification of genes involved in post-natal change of colour in the Gasconne breed.**

Recently, our team identified at the molecular level the dilution factor, well known to breeders, which characterized the Charolais cattle breed and to some extent the Simmental breed. In fact, the two alleles *Dc* (Charolais dilution) and *Ds* (Simmental dilution) alleles, are associated to coat colour dilution, and both affect the signal peptide of Silver/Pmel17 protein. This latter is crucial for melanosome biogenesis. With the aim to understand the mechanism of dilution due to these two alleles, we have undertaken a Gene-targeting in mouse approach and an *in vitro* study. Given the abundance of repeated sequences in the murine *Silver* gene, we couldn't obtain transgenic mice that harbour the same mutations as cattles. On the other hand, the cellular approach revealed an inhibitor effect of the *Dc* mutation on the cleavage of signal peptide sequence, located to the N-terminus of Silver protein. Moreover, the transcriptomic approach that we conducted to understand the post-natal change of coat colour in Gasconne breed, shows an overexpression of all the analysed genes, except for *Agouti* gene. Indeed, *Agouti* expression remains unchanged whatever the coat colour is.

Keywords : Silver, Charolais, Gasconne, coat colour, melanocyte, melanin, signal peptide, mouse.