

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**ECOLE DOCTORALE Biologie – Santé ED 524**

**FACULTE des Sciences et Techniques**

**Institut Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques (GEIST)**

**Unité de Génétique Moléculaire Animale (UGMA)**

**UMR 1061 INRA/Université de Limoges**

**Thèse N° [12-2013]**

**Thèse**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

**Discipline : Biologie, Sciences, Santé**

Présentée et soutenue publiquement par

**Almine ABDOULAYE SEYBOU**

le 16/05/2013

**Coloration de la robe chez le bovin**

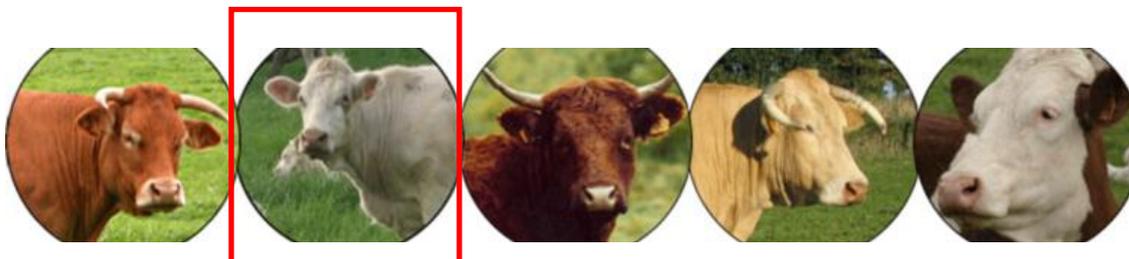
**Etude fonctionnelle de l'allèle (*si*) du gène *SILVER/PMEL17* chez la race  
Charolaise**

Directeur de thèse : Pr. Ahmad OULMOUDEN

**JURY :**

**Rapporteurs:** Mme Michèle TIXIER-BOICHARD, Directrice de recherches, INRA  
Mr Carlo RENIERI, Professeur, Université de Camerino, Italie

**Examineurs:** Mr Patrice MARTIN, Directeur de recherches, INRA  
Mme Véronique BLANQUET, Professeur, Université de Limoges  
Mr Ahmad OULMOUDEN, Professeur, Université de Limoges



## ***REMERCIEMENTS***

Je tiens à remercier les membres du jury pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail, madame Véronique Blanquet de m'avoir fait l'honneur de présider le jury, madame Michèle Tixier-Boichard et monsieur Carlo Renieri d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteur, monsieur Patrice Martin et monsieur Ahmad Oulmouden d'avoir bien voulu examiner ce travail.

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 matériels pour mener à bien ce travail.

J'exprime ma gratitude à monsieur Abderrahmane Maftah pour m'avoir accueilli au sein de l'UGMA. Je souhaite le remercier pour ses conseils et sa disponibilité.

J'exprime également ma gratitude à madame Véronique Blanquet pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je souhaite la remercier pour le suivi du déroulement de ma thèse et pour ses conseils.

Je remercie bien évidemment et tout particulièrement Ahmad Oulmouden pour avoir encadré mes travaux de thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée, pour sa rigueur scientifique, son énergie, sa disponibilité et sa grande gentillesse. Ce fut un grand honneur de travailler sous sa direction. Grand merci Ahmad !

Je souhaite adresser un merci particulier à Khaled Bouhouch pour tout le temps qu'il a consacré à la lecture attentive de ce manuscrit. Je le remercie également pour l'amitié qu'il m'a accordée, son aide et ses précieux conseils tout au long de cette thèse.

Je remercie les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet de thèse. Je pense notamment à celles avec qui j'ai eu le plaisir de partager une paillasse : Lamia Hadj-Rabia, Sylvia Bardet-Coste et Claire Bouyer. Merci pour nos nombreuses réflexions scientifiques, pour l'aide que vous m'avez apporté, pour vos amitiés et tout le temps passé ensemble. Je souhaite une bonne continuation à Claire, petite dernière de ce

quatuor. Merci également à Claire Carrion pour ses conseils précieux en microscopie confocale et pour sa grande gentillesse.

Je tiens à remercier tous ceux au sein du laboratoire qui m'ont consacré du temps et échangé avec moi leurs expériences. Merci donc à François Gallet, Fabrice Dupuy, Sébastien Legardinier, Nathalie Duprat, Emilie Pinault, Lionel Forestier et Karine Vuillier. Merci également à mes collègues et amis thésards, Katy Heu, Caroline Brun, Vincent Grassot, Audrey Dervartanian et tous les nouveaux venus. Je remercie tout particulièrement Amel Bouchatal pour son amitié, sa générosité et nos pauses d'entre deux manips.

J'adresse des vifs remerciements à Anne Blondeau Da Silva pour ses qualités humaines, son amitié, sa sollicitude et sa très grande gentillesse.

L'exhaustivité d'une telle liste n'étant jamais certaine, je souhaiterais adresser des remerciements à l'ensemble du personnel de l'UGMA.

Je remercie tendrement ma chère mère pour sa présence à mes côtés, pour son soutien indéfectible et ses encouragements qui m'ont porté jusqu'au doctorat.

J'adresse toute mon affection à ma chère Lucie et à mon fils Marwane. Merci pour votre amour inconditionnel. Je vous dédie ce travail.

## ***PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS***

**Publication :** Abdoulaye Seybou. A and Oulmouden A (2013). The natural mutation within the signal peptide repeals the full maturation of melanosomal protein SILVER/PMEL17 and causes hypopigmentation in cattle (Pigment cell and melanoma research). En preparation.

**Communication écrite:** Abdoulaye Seybou. A (2010) Etude fonctionnelle des allèles du gène SILVER/PMEL17 : coloration de la robe chez le bovin et formation des amyloïdes fonctionnelles. 13ème séminaire des thésards INRA, 6-7 avril, Pornichet, France.

**Communication orale:** Abdoulaye Seybou. A (2011) Functional studies of the SILVER/PMEL17 allele of the charolaise breed. 14ème séminaire des thésards INRA, 5-6 avril, Limoges, France.

**Workshops :** "Le monde des ARN et la génétique animale : intérêts, méthodes et difficultés" ; "génotypage et séquençage haut débit, peut-on parler du nouveau métier de bio-analyste". 15ème séminaire des thésards INRA, 26-27 mars 2012, île d'Oléron, France.

## ***ABBREVIATIONS***

- A : adénosine
- ACTH : adrenocorticotrophic hormone
- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- Agouti A<sup>pb</sup> : Agouti patterned blackish
- allèle a<sup>w</sup> : Agouti White-bellied
- allèle Cs : colour-sided
- allèle Dc/ si : Dilution charolais/ allele Silver Charolais
- allele Ds : Dilution Simmental
- AOC 1 : Albinisme oculo-cutané de type I
- AOC 3 : Albinisme oculo-cutané de type 3
- AP : protéines adaptatrices
- ARN : acides ribonucléiques
- ASP : Agouti Signaling Protein
- Bet : bromure d'éthidium
- 6BH4 : 6(R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine
- BLOC-1 : Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex 1
- BSA : Bovine Serum Albumin
- Bt : mutation Belted
- CREB : cAMP Response Element Binding Protein
- CYT : domaine cytoplasmique
- Dct : DOPA chrome tautomérase
- DHI : 5,6 dihydroxyindole
- DHICA : acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique
- DKK1 : Dickkopf 1
- dT : déoxyThymine
- Edn3 ou ET: Endothéline 3
- Ednrb : Récepteur à l'endothéline 3
- EEA1 : Early Endosome Antigen 1
- Endo H : Endoglycosidase H
- ERAD : ER-Associated Degradation
- bFGF : basic Fibroblaste Growth Factor
- FSH : Follicle Stimulating Hormone
- Genome scan : balayage du génome
- GFP : Green Fluorescent Protein
- Ghost pattern : profil d'ombre
- GMPc : acide guanosine monophosphorique cyclique
- Hela : cellules épithéliales dérivées du cancer du col de l'utérus
- HGF : Hepatocyte Growth Factor
- 6XHis : étiquette polyhistidine
- IL-1, IL-6 : Interleukine 1, 6
- $\beta$ -imidazolylethylamine : histamine
- KLD : Kringle-Like Domain
- KNTase : Kanamycine NucleotidylTransferase
- KO : Knock Out
- Lamp-1,-2 et -3 : Lysosome Associated-Membran Protein

- LB : milieu de culture Luria Bertani
- L-DOPA : L-dihydroxyphenylalanine
- LH : Luteinizing Hormone
- Locus W : dominant White spotting
- Locus Bc : Brockling
- Locus S : Spotting
- LT : Leucotriènes
- LYST : Lysosomal trafficking regulator gene
- MART1 : Melanoma Antigen Recognized by T cells 1 gene
- MATP : Membran Associated Transporter Protein
- Mcr : Mélanocortine
- Mc1R : Melanocortin receptor 1
- MCF : Mast Cell growth Factor ou Steel Factor gene
- Mel220 : Cellule de mélanome, négative pour l'expression endogène de Pmel17
- MITF : Microphthalmia Associated Transcription Factor
- Mlph : Mélanophiline
- MNT-1 : cellules de mélanomes humains
- MSH : Melanocortin Stimulating Hormone
- MT : tampon Mannitol – Tris
- Mutation DWhite : Mutation Dominant White
- Mutation D : Mutation Dun
- Mutation fdv : Mutation fading vision
- Mutation si : Mutation récessive Silver
- Mutation S : Mutation Smoky
- Ni : Nickel
- NK : Cellules Natural Killer
- NO : Monoxyde d'azote
- NTA : groupements nitrilotriacétiques
- NTR ou N-term: Domaine N-terminal
- p300/CBP : cAMP Binding Protein
- Par-2 : Proteinase-activated receptor 2
- PAX3 : Facteur de transcription Paired-box 3
- PC : Proprotéine convertase
- PCs : Prohormones convertases
- PDGF : Platelet-Derived Growth factor
- PG : Prostaglandines
- PKD, PKD1: Polycystic Kidney Disease-like Domain
- PMSF : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluor
- POMC : Proopiomélanocortine
- Protéine 58K : formiminotransférase cyclodéaminase
- PS : Peptide signal
- RPE : Epithélium pigmenté rétinien
- RPT : Région répétée
- rpm : rotation par minute
- SCF : Stem Cell Factor ou Steel factor
- SINE : Short INterspersed Element
- SLP2-a : Synaptoagmin-like protein2-a
- SOX 10 : Facteur de transcription Sex-determining region Y-box 10
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- T : thymidine

- TAE : Tampon Tris-HCl – EDTA - acétate de sodium
- TBST-L : Tampon Tris – NaCl - Tween 20 – lait
- TCA : Acide Trichloro-Acétique
- TGFβ1 : Transforming Growth Factor- β1
- TGN : Trans-Golgi Network
- TM : Domaine Transmembranaire
- TNFα : Tumor Necrosis Factor-α
- TPA : Tetradecanoyl phorbol acetate
- TX : thromboxane
- Tyrp1/Trp1 : Tyrosinase Related-Protein 1
- Tyrp2/Trp2 ou Dct : Tyrosinase Related-Protein 2 ou Dopachrome tautomerase
- UV : Radiations ultraviolettes
- YNB : Milieu de culture Yeast Nitrogen Base
- YNBRaff : Milieu de culture Yeast Nitrogen Base + raffinose
- YPG : Milieu de culture Yeast Peptone + glucose

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>4</b>
<b>I. PIGMENTATION DES MAMMIFERES</b>	<b>4</b>
1. Généralités sur la pigmentation des mammifères	4
2. Développement des mélanocytes	6
a. Migration et différenciation des mélanoblastes	6
b. Gènes et facteurs impliqués dans le développement des mélanocytes	7
b.1. Facteur de transcription Mitf	7
b.2. Récepteur c-kit et son ligand SCF	9
b.3. Facteur de transcription PAX3	10
b.4. Facteur de transcription SOX 10	10
b.5. Endothéline 3 (Edn3) et son récepteur Ednrb	11
b.6. Facteurs Wnt et la $\beta$ -caténine	11
b.7. Gène <i>ADAMTS20</i>	13
3. Localisation des mélanocytes	13
a. Mélanocytes cutanés	13
b. Mélanocytes extra-cutanés	15
4. Mélanogenèse	15
a. Structure du mélanosome	17
b. Biogenèse du mélanosome	18
c. Enzymes régulant la synthèse de mélanine	18
d. Pigments de mélanine	20
d.1. Différents types de mélanines	20
d.2. Biosynthèse des mélanines	22
d.3. Rôle des mélanines	23
e. Transport des mélanosomes	25
f. Transfert des mélanosomes aux kératinocytes	28
g. Dégradation des mélanosomes	30
5. Régulation de la mélanogenèse	30
<b>II. LOCI IMPLIQUES DANS LA COLORATION DES RACES BOVINES</b>	<b>34</b>
1. Gène <i>EXTENSION</i>	37
2. Gène <i>AGOUTI</i>	39
3. Gène <i>ALBINO</i>	41
4. Gène <i>DUN</i>	41
5. Gène <i>SILVER/PMEL17</i>	43
6. Phénotype white-spotting	43

a. Mutants du locus S	43
b. Mutants Blaze (Blason)	45
c. Mutants Roan	45
d. Mutants colour-sided (Flanc coloré)	47
e. Mutants Belted	47
f. Mutants Brockling	48
<b>III. SILVER/PMEL17</b>	<b>49</b>
1. Rôle	49
2. Gène <i>SILVER/PMEL17</i>	51
3. Transcrits Silver/Pmel17	51
4. Protéine Silver/Pmel17	53
5. Synthèse, trafic et adressage	54
6. Mart1/Melan-a : un partenaire mélanosomique de Silver/Pmel17	57
7. Mutations de <i>PMEL17</i> chez différentes espèces	59
a. Souris ( <i>Mus musculus</i> )	59
b. Homme ( <i>Homo sapiens</i> )	61
c. Poulet ( <i>Gallus gallus</i> )	63
d. Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	66
e. Cheval ( <i>Equus caballus</i> )	68
f. Poisson zèbre ( <i>Danio rerio</i> )	70
g. Bovin ( <i>Bos taurus</i> )	72
<b>IV. PROJET D'ETUDE</b>	<b>75</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>76</b>
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	<b>76</b>
1. Souche bactérienne	76
2. Souche de levure	76
3. Echantillons de peau bovine	76
4. Lignées cellulaires	77
5. Plasmides	77
a. TOPO XL PCR cloning vector	77
b. PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA	79
c. pRS326-Gal1-MCS-GFP	79
6. Anticorps	81
<b>II. CULTURE CELLULAIRE</b>	<b>83</b>
1. Culture des bactéries	83
2. Culture des levures	83
3. Culture des lignées cellulaires	84
a. Entretien des lignées	84
b. Congélation et décongélation	85

c.	Composition des milieux de cultures	85
<b>III.</b>	<b>METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>	<b>87</b>
1.	<b>Synthèse et amplification d'ADNc</b>	<b>87</b>
a.	Principe	87
b.	Préparation d'ARN totaux de peau	87
c.	Transcription inverse des ARN en ADNc	87
d.	Réaction de polymérisation en chaîne	88
e.	Séparation et purification des produits PCR par électrophorèse	90
2.	<b>Clonage d'ADNc</b>	<b>90</b>
a.	Constructions géniques	90
b.	Transformation des bactéries	91
c.	Extraction et purification d'ADN plasmidique à partir de cultures bactériennes	92
d.	Séquençage des échantillons d'ADN	94
<b>IV.</b>	<b>METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE</b>	<b>95</b>
1.	<b>Transformation des levures</b>	<b>95</b>
2.	<b>Transfection transitoire des cellules par lipofection</b>	<b>95</b>
<b>V.</b>	<b>METHODES DE BIOCHIMIE</b>	<b>98</b>
1.	<b>Préparation d'extraits de protéines totales de levures</b>	<b>98</b>
2.	<b>Fractionnement subcellulaire sur levures</b>	<b>98</b>
3.	<b>Préparation d'extraits de protéines totales à partir de tissu (peau) et de cellules de mammifères</b>	<b>99</b>
4.	<b>Purification de protéines étiquetées au 6XHis</b>	<b>100</b>
a.	Principe	100
b.	Lyse cellulaire	100
c.	Capture des protéines	101
d.	Elution	101
5.	<b>Dosage protéique</b>	<b>101</b>
6.	<b>Western blotting</b>	<b>102</b>
a.	Electrophorèse des protéines	102
b.	Electrotransfert des protéines	102
c.	Immuno-révélation des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose par la méthode ECL <sup>TM</sup>	103
<b>VI.</b>	<b>METHODES DE MICROSCOPIE CONFOCALE</b>	<b>104</b>
1.	<b>Préparation des coupes de peau</b>	<b>104</b>
2.	<b>Triple immunomarquage</b>	<b>104</b>
3.	<b>Analyse en microscopie confocale</b>	<b>105</b>

<b>RESULTATS – DISCUSSION</b>	<b>106</b>
<b>I. STRATEGIES MISES EN PLACE</b>	<b>106</b>
<b>II. ANTICORPS SPECIFIQUES DU NIVEAU DE MATURATION DE LA PROTEINE</b>	<b>109</b>
<b>III. DETECTION DE LA PROTEINE PMEL17 CHAROLAISE A PARTIR D'EXTRAITS PROTEIQUES DE PEAU</b>	<b>111</b>
1. Analyses western blotting avec l'anticorps $\alpha$ PEP13	111
2. Analyses western blotting avec l'anticorps $\alpha$ PEP13h	114
3. Analyses western blotting avec l'anticorps HMB45	115
4. Discussion relative à la détection de Pmel17 par western blotting avec les anticorps $\alpha$ PEP13, $\alpha$ PEP13h et HMB45 au sein d'extraits protéiques de peau	116
<b>IV. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTEINE PMEL17 CHAROLAISE</b>	<b>118</b>
1. Marqueurs spécifiques des organites de la voie de sécrétion de Pmel17	119
a. Partenaires de Pmel17 au sein du mélanosome	119
b. Marqueurs des compartiments précoces de la biosynthèse de Pmel17	119
2. Détection des enzymes de la famille des tyrosinases à partir d'extraits protéiques tissulaires	122
3. Paramètres d'acquisition des données de localisation subcellulaire	124
4. Analyse des données de localisation subcellulaire	127
a. Localisation des fibrilles matures Pmel17 avec les enzymes de la famille des tyrosinases	127
b. Localisation des formes précoces de Pmel17 avec les enzymes Tyr et Tyrp2	131
c. Localisation de Pmel17 dans le RE	134
d. Localisation de Pmel17 dans le Golgi	136
e. Localisation de Pmel17 dans l'endosome précoce et le lysosome	136
5. Discussion relative à la localisation subcellulaire de la protéine Pmel17 Charolaise	137
<b>V. EXPRESSION DE LA PROTEINE PMEL17 CHAROLAISE AU SEIN DE DIFFERENTS MODELES CELLULAIRES</b>	<b>141</b>
1. Expression de Pmel17 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	141
a. Système Y10000 [pRS326-Pmel17-GFP/6xHis]	143
b. Analyse western blotting sur le système levure avec l'anticorps	

dirigé contre la GFP	145
c. Analyse western blotting de fractions subcellulaires de levures avec l'anticorps dirigé contre la GFP	148
d. Analyse western blotting sur le système levure avec l'anticorps dirigé contre l'étiquette 6XHis	150
e. Analyse western blotting de fractions subcellulaires de levures avec l'anticorps Penta His HRP	152
f. Discussion relative à l'expression de Pmel17 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	153
2. Expression de Pmel17 dans les cellules Melan-a, COS7 et CHO-K1	157
<b>CONCLUSION</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>163</b>

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

• <b>Figure 1</b> : Développement embryonnaire, migration et différenciation des mélanoblastes en mélanocytes	5
• <b>Figure 2</b> : Voies de transduction des signaux de migration, de développement et de différenciation des mélanocytes	8
• <b>Figure 3</b> : Structure de la peau	12
• <b>Figure 4</b> : Structure de l'épiderme	14
• <b>Figure 5</b> : Localisation des mélanocytes épidermiques et folliculaires	14
• <b>Figure 6</b> : Stades (I, II, III et IV) de la biogenèse des eumélanosomes (a-f) et des phéomélanosomes (g-j) observés en microscopie électronique	16
• <b>Figure 7</b> : Voie de synthèse des mélanines	21
• <b>Figure 8</b> : Diagramme schématisé du transport des mélanosomes vers les extrémités dendritiques	24
• <b>Figure 9</b> : Modes de transfert des mélanosomes aux kératinocytes	27
• <b>Figure 10</b> : Facteurs impliqués dans la régulation de la mélanogénèse au sein du mélanocyte	27
• <b>Figure 11</b> : Régulation de la mélanogénèse par des facteurs dérivés des fibroblastes, du sang, des intermédiaires de l'inflammation et des cellules nerveuse	29
• <b>Figure 12</b> : Représentations de l'aurochs, <i>Bos primigenius</i>	33
• <b>Figure 13</b> : Exemples de bovins portant les différents allèles définis pour le locus <i>Extension</i>	36
• <b>Figure 14</b> : Exemples de bovins portant différents allèles définis pour le locus <i>Agouti</i>	38
• <b>Figure 15</b> : Exemples de bovins portant l'allèle hypothétique <i>dn</i> du locus <i>Dun</i>	40
• <b>Figure 16</b> : Exemples de bovins portant différents allèles définis pour le locus <i>S (Spotting)</i>	42
• <b>Figure 17</b> : Exemples de bovins porteurs de l'allèle <i>Roan</i> à l'état homozygote et hétérozygote	44
• <b>Figure 18</b> : Taureau de race Texas Longhorn, porteur de l'allèle <i>Cs</i>	

(Colour-sided)	46
• <b>Figure 19</b> : Taureau de race Belted Galloway, porteur de l'allèle Bt (Belted )	46
• <b>Figure 20</b> : Gène SILVER/PMEL17, isoformes d'épissage et allèles présents chez différents espèces	50
• <b>Figure 21</b> : Diagramme schématique de la protéine Pmel17 et des différents domaines qui la composent	52
• <b>Figure 22</b> : Diagramme schématique de la maturation et de l'adressage de la protéine Pmel17	55
• <b>Figure 23</b> : Phénotype Silver	58
• <b>Figure 24</b> : Poulets exprimant les phénotypes sauvage (wild type), Dominant white et Smoky	62
• <b>Figure 25</b> : Chiens de race Shetland Sheepdog porteurs ou non de la mutation Merle	65
• <b>Figure 26</b> : Description phénotypique de chevaux portant la mutation Silver	67
• <b>Figure 27</b> : Pigmentation du corps du mutant fading vision (fdv)	69
• <b>Figure 28</b> : Mutations du gène SILVER/PMEL17 bovin, spécifiques des races Simmental, Blonde d'Aquitaine et Charolaise	71
• <b>Figure 29</b> : Mise en évidence de l'ultrastructure des mélanosomes au niveau de peaux bovines	74
• <b>Figure 30</b> : Réaction d'insertion du produit PCR au sein des plasmides TOPO XL PCR cloning vector et PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA	78
• <b>Figure 31</b> : Cartographie des différents sites du plasmide PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA	78
• <b>Figure 32</b> : Cartographie des différents sites du plasmide pRS326-Gal1-MCS-GFP	80
• <b>Figure 33</b> : Diagramme schématique de la réaction de PCR avec la Taq Expand High Fidelity PCR system	89
• <b>Figure 34</b> : Diagramme schématique de la réaction de PCR avec la Taq PCR Mastermix	89
• <b>Figure 35</b> : Diagramme schématique de la réaction de séquence	94
• <b>Figure 36</b> : Représentation schématique du fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle	97
• <b>Figure 37</b> : Réaction de chélation de la polyhistidine par la matrice NI-NTA	100

• <b>Figure 38</b> : Schéma du clivage du peptide signal	107
• <b>Figure 39</b> : Diagramme schématique de la structure primaire de la protéine Pmel17 sauvage	108
• <b>Figure 40</b> : Diagramme schématique des différents isoformes de Pmel17	108
• <b>Figure 41</b> : Profil de détection western blotting avec l'anticorps $\alpha$ PEP13 sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines de races Charolaise (Char), Parthenaise (Par) et Salers (Sal) comparé à celui d'extraits protéiques de mélanocytes murins	110
• <b>Figure 42</b> : Profil de détection western blotting avec l'anticorps $\alpha$ PEP13h sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines des races Charolaise (Char), Holstein (Hol) et Limousine (Lim) comparé à celui d'extraits protéiques de mélanocytes murins	113
• <b>Figure 43</b> : Profil de détection western blotting avec l'anticorps HMB45 sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines	115
• <b>Figure 44</b> : Profil de détection western blotting avec les anticorps anti Tyrp1, $\alpha$ PEP8h et $\alpha$ PEP7h sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines	121
• <b>Figure 45</b> : Contrôle de la fluorescence intrinsèque aux échantillons de peaux bovines	123
• <b>Figure 46</b> : Contrôle des signaux de fluorescence imputables à des interactions non spécifiques des anticorps secondaires	123
• <b>Figure 47</b> : Contrôle des signaux de fluorescence imputables à des interactions isotypiques	125
• <b>Figure 48</b> : Localisation des fibrilles Pmel17 avec la protéine Tyr par microscopie confocale	126
• <b>Figure 49</b> : Localisation des fibrilles Pmel17 avec la protéine Tyrp1 par microscopie confocale	128
• <b>Figure 50</b> : Localisation des fibrilles Pmel17 avec la protéine Tyrp2 par microscopie confocale	129
• <b>Figure 51</b> : Localisation des formes précoces de Pmel17 avec la protéine Tyr par microscopie confocale	130
• <b>Figure 52</b> : Localisation des formes précoces de Pmel17 avec la protéine Tyrp2 par microscopie confocale	132

- **Figure 53** : Localisation de la protéine Pmel17 dans le RE par  
microscopie confocale\_\_\_\_\_133
- **Figure 54** : Localisation de la protéine Pmel17 dans le Golgi par  
microscopie confocale\_\_\_\_\_135
- **Figure 55** : Induction de la protéine de fusion Pmel17-GFP\_\_\_\_\_142
- **Figure 56** : Profil de détection western blotting avec l'anticorps dirigé contre  
la GFP sur des extraits protéiques totaux de levure exprimant la GFP, le  
variant et l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés à la GFP\_\_\_\_\_144
- **Figure 57** : Profil de détection western blotting avec l'anticorps dirigé contre  
la GFP sur des fractions cellulaires issues de levures exprimant la GFP, le  
variant et l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés à la GFP\_\_\_\_\_147
- **Figure 58** : Profil de détection western blotting avec l'anticorps penta His  
HRP sur des extraits protéiques totaux de levures exprimant le variant et  
l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés à l'étiquette 6xHis \_\_\_\_\_149
- **Figure 59** : Profil de détection western blotting avec l'anticorps dirigé  
contre l'étiquette 6XHis sur des fractions cellulaires issues de levures  
exprimant le variant et l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés au 6XHis\_\_\_\_\_151
- **Figure 60** : Profil de détection western blotting avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h sur  
des extraits protéiques de cellules Melan-a, COS7 et CHO-K1 transfectées  
avec les différentes constructions pCDNA3.1\_\_\_\_\_156

## **TABLE DES TABLEAUX**

- **Tableau 1** : Loci génétiques décrits chez le bovin \_\_\_\_\_ 35
- **Tableau 2** : Anticorps spécifiques de Pmel17 \_\_\_\_\_ 81
- **Tableau 3** : Anticorps spécifiques des enzymes de la famille des tyrosinases \_\_\_\_\_ 81
- **Tableau 4** : Marqueurs compartimentaux \_\_\_\_\_ 82
- **Tableau 5** : Anticorps dirigés contre les protéines de fusion \_\_\_\_\_ 82
- **Tableau 6** : Liste des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage  
de Pmel17 \_\_\_\_\_ 93
- **Tableau 7** : Association des anticorps utilisés pour la localisation de Pmel17 \_\_\_\_\_ 120

*INTRODUCTION*

La pigmentation de la peau, des phanères ou encore des yeux est un des caractères phénotypiques les plus directement accessible à l'observateur tant chez l'homme que chez les animaux. Dès lors, les chercheurs se sont attachés à élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette coloration.

Il est bien établi que chez les mammifères, la pigmentation est principalement définie par la distribution ainsi que la quantité relative de pigments de pheomélanine et d'eumélanine, qui produisent respectivement des colorations rouge/jaune et marron/noire (Hearing and Tsukamoto 1991; Jackson 1993). Ces pigments sont synthétisés par les mélanosomes, organites apparentés aux lysosomes au sein des mélanocytes, cellules épidermiques dérivées de la crête neurale (Silvers 1979).

Les premières connaissances cellulaires sur la formation des pigments ont été le point de départ des études de génétique de la coloration. La compréhension des mécanismes par lesquels les gènes qui déterminent la coloration interagissent et produisent leurs effets, constituent le fil conducteur d'un grand nombre de recherches.

La pigmentation a servi de base de classification raciale des animaux domestiques et plus particulièrement ceux d'élevage. Chez l'espèce bovine, les études de déterminisme génétique de coloration de la robe sont nées d'un besoin croissant de traçabilité des produits d'origine bovine, tant de la part des professionnels que des consommateurs.

A ce jour, les analyses génétiques relatives à la coloration de la robe des bovins ont permis de mettre en évidence les principaux loci et allèles qui affectent la pigmentation chez cette espèce. L'étude des bases moléculaires responsables du patron de coloration de la robe des bovins permet la compréhension des mécanismes moléculaires fondamentaux impliqués dans le processus de pigmentation des vertébrés et renseigne sur l'origine et l'évolution de certaines maladies humaines telles que les mélanomes.

Les travaux antérieurs réalisés par l'équipe coloration de l'UMR1061 INRA/Université de Limoges, à laquelle j'appartiens, se sont intéressés aux acteurs majeurs de la pigmentation au sein des principaux groupes fonctionnels : les gènes *AGOUTI* et *EXTENSION* qui contrôlent la synthèse des pigments en amont et les gènes de la famille des tyrosinases (*TYR*, *TYRP1*, *DCT*) qui *in fine* participent directement à la synthèse de pigments. Les travaux

que je mène ciblent un acteur clé de la biogenèse du mélanosome, siège de la synthèse des mélanines, le gène *SILVER/PMEL17*.

La protéine Pmel17 est produite dans le réticulum endoplasmique (RE), puis transite dans l'appareil de Golgi où elle subit une glycosylation élaborée indispensable à sa fonction avant d'atteindre le mélanosome. Dans ce compartiment, elle est responsable de la formation des structures fibrillaires qui constituent la matrice du mélanosome au stade II. Ces fibres se forment à partir d'un fragment nommé  $M\alpha$  dérivant de la protéine Pmel17 par clivage protéolytique. Ces fibres présentent toutes les caractéristiques physico-chimiques des amyloïdes pathologiques, y compris leur conformation structurale en feuillet  $\beta$  typiquement observable par diffraction aux rayons X. Ces amyloïdes sont des structures quaternaires fibreuses formées par l'assemblage de protéines ou de monomères peptidiques, stabilisés par des liaisons hydrogènes. Elles ont été découvertes dans le contexte de maladies humaines dont la plus connue sur le plan clinique est la maladie d'Alzheimer.

L'équipe coloration de l'UMR1061 a identifié deux allèles du gène *SILVER/PMEL17* en plus de l'allèle sauvage chez le bovin (Oulmouden et al. 2005). L'un de ces allèles affecte la biogenèse du mélanosome chez la race bovine Charolaise et lui confère une robe de couleur blanche. Par ailleurs, cet allèle (*si*) caractérise tous les animaux de cette race à l'exclusion de tous les animaux des autres races bovines et constitue de ce fait, un marqueur génétique unique en son genre. L'originalité de cette découverte a fait l'objet d'un brevet international (INRA/Université de Limoges). La particularité de l'allèle Charolais est qu'il consiste en une substitution dans le peptide signal de la protéine Pmel17, seul cas de mutation répertorié dans ce domaine protéique au sein des gènes de la coloration, supposé être à l'origine d'une perte totale de fonction de la protéine. L'hypothèse la plus répandue est que cette mutation engendrerait un blocage de la protéine Pmel17 au niveau du RE. Ainsi, l'élaboration fonctionnelle de la matrice du mélanosome n'aurait pas lieu et ce dernier resterait bloqué à son premier stade de la biogenèse (stade pré-mélanosome) sous forme de vésicules non fonctionnelles.

Les travaux présentés dans cette thèse consistent à démontrer que l'absence d'élaboration fonctionnelle de la matrice du mélanosome, responsable du phénotype blanc crémeux de la robe du bovin charolais est associée à la mutation dans la région codant le peptide signal du gène *SILVER/PMEL17*.

La première partie de ce manuscrit consiste à dresser l'état de l'art des connaissances bibliographiques. Elle comporte trois chapitres. Le premier chapitre concerne la description du système pigmentaire sous un aspect cellulaire. Après quelques données d'ordre général sur la pigmentation des mammifères, le processus de développement des mélanocytes, les facteurs impliqués dans ce processus ainsi que les différents types de mélanocytes seront présentés. La synthèse de pigments sera abordée au travers d'une description des structures cellulaires et des différents acteurs impliqués dans la synthèse ou dans le transfert de ces pigments. Enfin, les principaux acteurs de la régulation de cette synthèse seront présentés. Le deuxième chapitre est consacré à la génétique de la coloration de la robe chez le bovin. Enfin, le troisième chapitre décrira les caractéristiques du gène *SILVER/PMEL17* et dressera le bilan des données concernant les allèles de ce gène chez plusieurs espèces. La deuxième partie du manuscrit présentera les moyens et techniques employés dans cette étude. Ensuite, la troisième partie consistera en la présentation et la discussion des résultats obtenus. Les deux premiers chapitres seront consacrés aux descriptions respectives, des stratégies mises en place et des anticorps spécifiques de la protéine Pmel17. Les chapitres suivants traiteront l'un après l'autre de la détection *in situ* de la protéine Pmel17 Charolaise, sa localisation subcellulaire puis, son expression au sein de différents modèles cellulaires. Pour finir, la dernière partie s'attachera à présenter les conclusions et perspectives qui découlent de ces travaux.

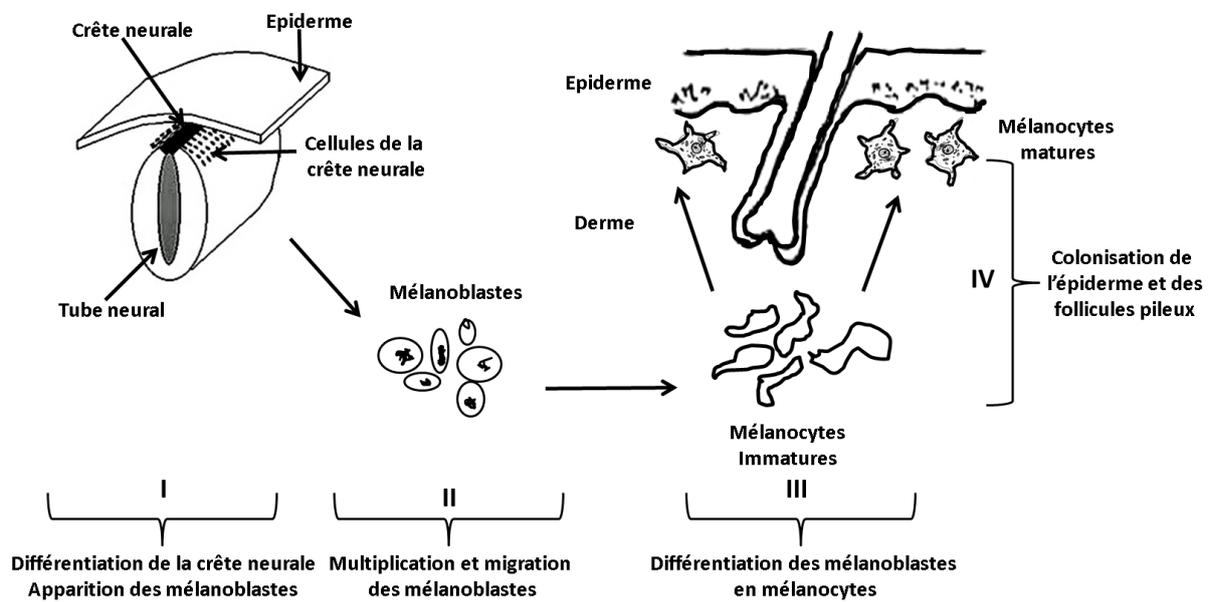
# *EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE*

# I. PIGMENTATION DES MAMMIFERES

## 1. Généralités sur la pigmentation des mammifères

La pigmentation est un des caractères phénotypiques les plus directement accessibles à l'observateur tant chez l'homme que chez les animaux. Les variations de couleurs entre différents animaux ont toujours suscité un vif intérêt : pour exemple la mutation *albino* chez la souris connue et « entretenue » du temps des Grecques et des Romains. Ce fut d'ailleurs le premier caractère mammalien à être analysé selon les principes de Mendel au début du XX<sup>ème</sup> siècle. A la fin de ce même siècle, les théories Mendéliennes de liaisons et d'assortiments indépendants des caractères de la pigmentation ont permis d'établir la première carte de liaison du génome de la souris. La clé de voûte de l'analyse systématique et rigoureuse de souris présentant des anomalies de pigmentation fut le livre de Silvers (Silvers 1979). L'étude de ces mutations chez la souris a grandement contribué à la clarification des bases génétiques affectant la coloration et à la compréhension de maladies génétiques humaines ayant les mêmes altérations moléculaires (Barsh 1996; Jackson 1997). Les mutations entraînant une surexpression de la protéine Agouti Signaling Protein (ASP), un antagoniste du récepteur aux mélanocortines (Melanocortin receptor 1, Mc1R) sont par exemple, à l'origine de la mise en évidence du rôle de ces mélanocortines dans l'homéostasie du poids. L'étude de mutants naturels et ceux issus de programmes de mutagenèse aléatoire ont permis d'identifier plus de 127 loci et 800 allèles impliqués dans la pigmentation des mammifères (Bennett and Lamoreux 2003). L'ensemble des mutations répertoriées à ce jour représente des acteurs moléculaires répartis au sein de différents groupes fonctionnels du processus de pigmentation : le développement et la différenciation des mélanocytes, les constituants, la biogenèse, le transport des mélanosomes ainsi que le contrôle du « switch » de la pigmentation.

La couleur de la peau, du pelage et des yeux des mammifères est déterminée par la quantité relative de deux pigments de mélanine : l'eumélanine et la phéomélanine.



**Figure 1 : Développement embryonnaire, migration et différenciation des mélanoblastes en mélanocytes (Wasmeier et al. 2008).**

L'origine du nom mélanine, du grec *melanos*, n'est pas claire mais est habituellement attribuée au chimiste suédois Berzelius (Berzelius 1840). Ces pigments mélaniques sont synthétisés au sein d'organites appelés mélanosomes, spécifiques des cellules spécialisées, les mélanocytes.

Le processus de pigmentation requière un certain nombre d'étapes qui doivent se succéder selon un ordre bien précis : le développement, la migration, la survie et la prolifération des mélanoblastes, leur différenciation en mélanocytes et enfin, les mélanocytes doivent être capables de produire des mélanosomes et de synthétiser les pigments mélaniques.

## **2. Développement des mélanocytes**

### **a. Migration et différenciation des mélanoblastes**

Les cellules précurseuses de la lignée mélanocytaire dérivent de la crête neurale au cours du développement embryonnaire des mammifères. La crête neurale correspond à une population cellulaire pluripotente située dorsalement au tube neural (Figure 1). Les cellules de la crête neurale migrent et colonisent un très grand nombre de tissus embryonnaires. Leurs différenciations seront à l'origine des cellules du système nerveux périphérique (neurones et cellules gliales), de toutes les cellules pigmentées de l'organisme, à l'exception des cellules endocriniennes des glandes surrénales et thyroïdiennes et des cellules de l'épithélium rétinien issues du neuroectoderme (Dupin et al. 2007).

Les mélanocytes ont pour précurseurs les mélanoblastes qui sont localisés préférentiellement au niveau de la partie dorso-médiale de la crête neurale (Wilson et al. 2004). Chez la souris, les mélanoblastes se forment à partir des cellules pluripotentes de la crête neurale à 8 jours et demi de développement embryonnaire. A ce stade, les mélanoblastes migrent selon l'axe dorso-latéral entre le dermatome et l'ectoderme. A 10 jours et demi de développement embryonnaire, ils migrent ventralement à travers le derme en développement. Ils envahissent l'épiderme à partir de 14 jours et demi de développement embryonnaire puis migrent vers les follicules pileux en développement où ils continuent à proliférer et à se différencier (Mayer 1973; Jordan and Jackson 2000). Ils colonisent en plus de la peau, la choroïde, l'iris, l'oreille interne, les leptoméninges (chez l'homme), l'arbre trachéobronchique, les voies nasales supérieures et le mésentère (Freedberg et al. 1999).

La différenciation des mélanoblastes en mélanocytes est caractérisée par l'acquisition de prolongements dendritiques et la capacité de synthèse de mélanine par les mélanosomes (Wasmeier et al. 2008).

## **b. Gènes et facteurs impliqués dans le développement des mélanocytes**

La survie, la différenciation, la prolifération et la migration des mélanoblastes et/ou des mélanocytes sont contrôlées par un ensemble de gènes, la plupart codant des facteurs de transcription ou des protéines du système de signalisation intracellulaire.

### **b.1. Facteur de transcription Mitf**

Le gène *Microphthalmia Associated Transcription Factor (MITF)* est conservé chez plusieurs espèces de vertébrés : l'homme, la souris, le rat et le poulet (Lin and Fisher 2007). Il code pour un facteur de transcription appartenant à la famille des basic/ helix-loop-helix/ leucine-zipper (bHLH-Zip). Mitf est le marqueur le plus précoce de l'engagement des cellules de la crête neurale vers la lignée mélanocytaire (Goding 2000). Sa présence semble d'ailleurs indispensable à cet engagement. Mitf joue un rôle très important dans la survie, la migration et la prolifération des mélanoblastes. L'expression de Mitf est maintenue non seulement au cours des premières et des dernières étapes du développement des mélanocytes mais également dans les mélanocytes épidermiques normaux de l'adulte (Freedberg et al. 1999).

Les souris homozygotes mutées pour le gène *MITF* sont dépourvues de pigmentation (pelage blanc) et présentent une diminution des dimensions de l'œil appelée microphthalmie (Lin and Fisher 2007). Les hétérozygotes, en fonction de la localisation de la mutation, présentent soit un phénotype non pigmenté soit un ventre blanc (Steingrimsson et al. 2004).

Chez l'homme, les mutations affectant le gène *MITF* sont à l'origine du syndrome de Waardenburg de type IIA, une maladie autosomale dominante caractérisée par une dépigmentation hétérogène de l'iris (hétérochromie irienne) et une surdité neurosensorielle liée à l'absence de mélanocytes (Tassabehji et al. 1994).

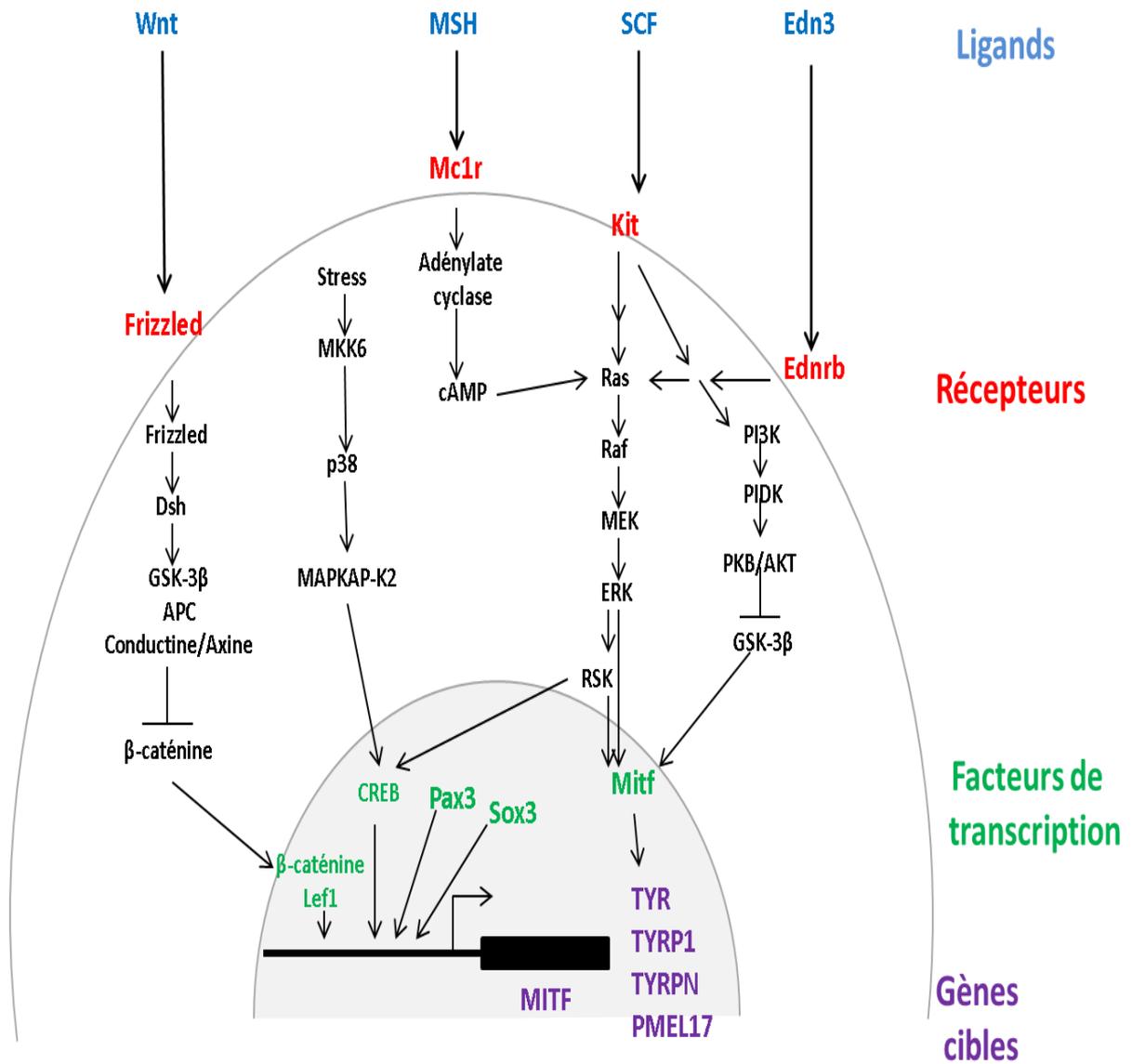


Figure 2 : Voies de transduction des signaux de migration, de développement et de différenciation des mélanocytes (Goding 2000).

Le facteur de transcription *Mitf* initie la transcription de plusieurs gènes spécifiques de la lignée mélanocytaire (Figure 2). Il régule l'expression des enzymes de la mélanogenèse *Tyr*, *Tyrb1*, *Tyrb2* (Yasumoto et al. 1997), des protéines de structure du mélanosome comme *Silver/Pmel17* (Du et al. 2003), et des acteurs impliqués dans la survie des mélanoblastes comme la protéine anti apoptotique *Bcl2* (McGill et al. 2002). L'expression de *Mitf* est régulée par un certain nombre de facteurs de transcription comme *Pax3*, *CREB*, *Sox10* et *Left*.

Le facteur de transcription *Mitf* interagit avec *c-Kit* une tyrosine kinase appartenant à la famille des récepteurs Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). Le facteur de transcription *Mitf* est nécessaire au maintien de l'expression de *c-Kit* et *c-Kit* module l'activité de *Mitf* (Goding 2000; Hou et al. 2000; Wilson et al. 2004).

## **b.2. Récepteur c-Kit et son ligand SCF (Stem Cell Factor) ou Steel Factor**

Le récepteur *c-Kit* et son ligand *SCF* sont codés respectivement par les gènes *KIT* et *KITL*. *c-Kit* appartient à la famille des récepteurs PDGF. Il est exprimé à la surface des mélanoblastes depuis leurs émergences de la crête neurale et continue à être exprimé à la surface des mélanocytes chez les animaux après la naissance (Peters et al. 2002). L'activation de *c-Kit* par son ligand induit la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine kinase du récepteur provoquant l'activation de cascades de signaux intracellulaires notamment la voie des MAP kinases, PI3 Kinases, JAK/STAT et des membres de la famille *Src* (Linnekin 1999). Par le biais de ces molécules transductrices, *c-Kit* délivre non seulement un signal anti-apoptotique pour la survie des mélanoblastes, mais permet aussi l'activation transitoire de *Mitf*, associée à l'augmentation du recrutement du co-activateur *p300/CBP* (*cAMP Binding Protein*) pour stimuler l'activité transcriptionnelle de son gène. Le signal envoyé par *c-Kit* permet ainsi la survie, la prolifération et la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes (Yoshida et al. 1996; Goding 2000). *c-Kit* semble également jouer un rôle dans l'activation du gène *TYR* codant pour la tyrosinase, enzyme clé de la mélanogenèse (Hou et al. 2000).

Chez la souris, des mutations touchant les loci *W* (*dominant White spotting*) et *steel* codant respectivement pour le récepteur *c-Kit* et son ligand *SCF* sont à l'origine de troubles de la pigmentation, de l'hématopoïèse et de la fertilité (Lin and Fisher 2007).

Chez l'homme, les mutations de *KIT* sont à l'origine de piébaldisme, une affection autosomale dominante. Le tableau clinique chez l'homme, consiste en une mèche blanche frontale, une achromie frontale triangulaire, pointe en bas, et une achromie affectant préférentiellement les zones médio-ventrales du tronc et les zones médianes des membres en épargnant relativement les extrémités (Lin and Fisher 2007).

### **b.3. Facteur de transcription Pax3 (*Paired-box 3*)**

Le facteur de transcription Pax3 joue un rôle important dans la prolifération et la migration des mélanoblastes à partir de la crête neural (Guaguere and Alhaidari 1992). Il régule également l'expression de *Mitf* et l'activité de *Tyrp1* (Goding 2000).

Des mutations affectant le facteur de transcription Pax3 sont à l'origine chez l'homme du syndrome de Waardenburg de type I et III. Le type I se traduit cliniquement par une surdité, des anomalies de la pigmentation sous forme de macules achromiques (zones ne contenant aucun pigment) et un dysmorphisme facial caractérisé par un écartement des canthi internes ( chancrure située à chaque coin de l'oeil). A toutes ces anomalies s'ajoute une hypoplasie du système musculo-squelettique chez les individus atteints par le syndrome de Waardenburg de type III (Guaguere and Alhaidari 1992).

### **b.4. Facteur de transcription Sox 10 (*Sex-determining region Y-box 10*)**

Le facteur de transcription Sox10 joue un rôle crucial dans la survie et le maintien des progéniteurs multipotents de la crête neurale et influence leurs devenir dans les étapes ultérieures de l'embryogenèse (Stanchina et al. 2006). Il participe à la détermination et à la différenciation des mélanocytes en régulant les gènes *MITF* et *TYRP2* (Stanchina et al. 2006). Les souris hétérozygotes mutées pour les gènes *SOX10* ou *MITF* ont un phénotype pigmenté avec quelques tâches hypopigmentées, tandis que, les souris doubles hétérozygotes mutées pour *SOX10* et *MITF* sont presque entièrement dépigmentées, ce qui conforte l'idée que *SOX10* et *MITF* agissent en synergie dans l'émergence ou le maintien de la lignée mélanocytaire (Bondurand et al. 2000).

Les mutations affectant le gène *SOX10* chez l'homme sont à l'origine du syndrome de Waardenburg de type IV qui se caractérise par des anomalies des mélanocytes ainsi qu'un déficit dans l'innervation entérique. Des mutations du gène codant pour le récepteur de l'endothéline B sont également responsables de l'apparition de ce même syndrome (Stanchina et al. 2006).

### **b.5. Endothéline 3 (Edn3) et son récepteur Ednrb**

L'endothéline 3 et son récepteur Ednrb sont des éléments essentiels au développement des mélanocytes au cours de l'embryogenèse. Les mutations « *lethal spotting* » et « *piebalde lethal* » des gènes codants pour l'endothéline 3 et son récepteur Ednrb sont responsables d'un développement mélanocytaire anormal. Les animaux homozygotes pour la mutation « *piebalde lethale* » présentent une perte presque totale de pigmentation. Cette perte de pigmentation est également observée mais à un degré moindre chez les animaux présentant la mutation « *lethal spotting* » (Stanchina et al. 2006). Les deux rôles clés de l'endothéline 3 au cours du développement des mélanocytes, consistent en la régulation de la multiplication du pool de progéniteurs des mélanocytes et en la stimulation de la différenciation des progéniteurs en mélanocytes matures. Par la voie des MAP kinases, les couples Edn3/Ednrb et SCF/c-Kit agissent en synergie pour induire la migration des mélanoblastes et la multiplication des progéniteurs des mélanoblastes (Reid et al. 1996; Imokawa et al. 2000).

### **b.6. Facteurs Wnt et la $\beta$ -caténine**

Les facteurs Wnt sont des glycoprotéines exprimées au cours de l'embryogenèse et impliquées dans le développement des mélanocytes. Les souris mutantes dépourvues de Wnt1 et de Wnt3a présentent une diminution importante du nombre de mélanocytes ainsi que de l'ensemble des cellules dérivées de la crête neurale (Freedberg et al. 1999; Dunn et al. 2000). Wnt induit entre autre la synthèse de la  $\beta$ -caténine, une protéine impliquée dans différents processus, comme l'adhésion cellulaire, médiée par les cadhérines. Il a été démontré chez les souris déficientes en  $\beta$ -caténine une absence d'expression de Mitf et des tyrosinases Tyrp1 et Tyrp2 (Dunn et al. 2000).

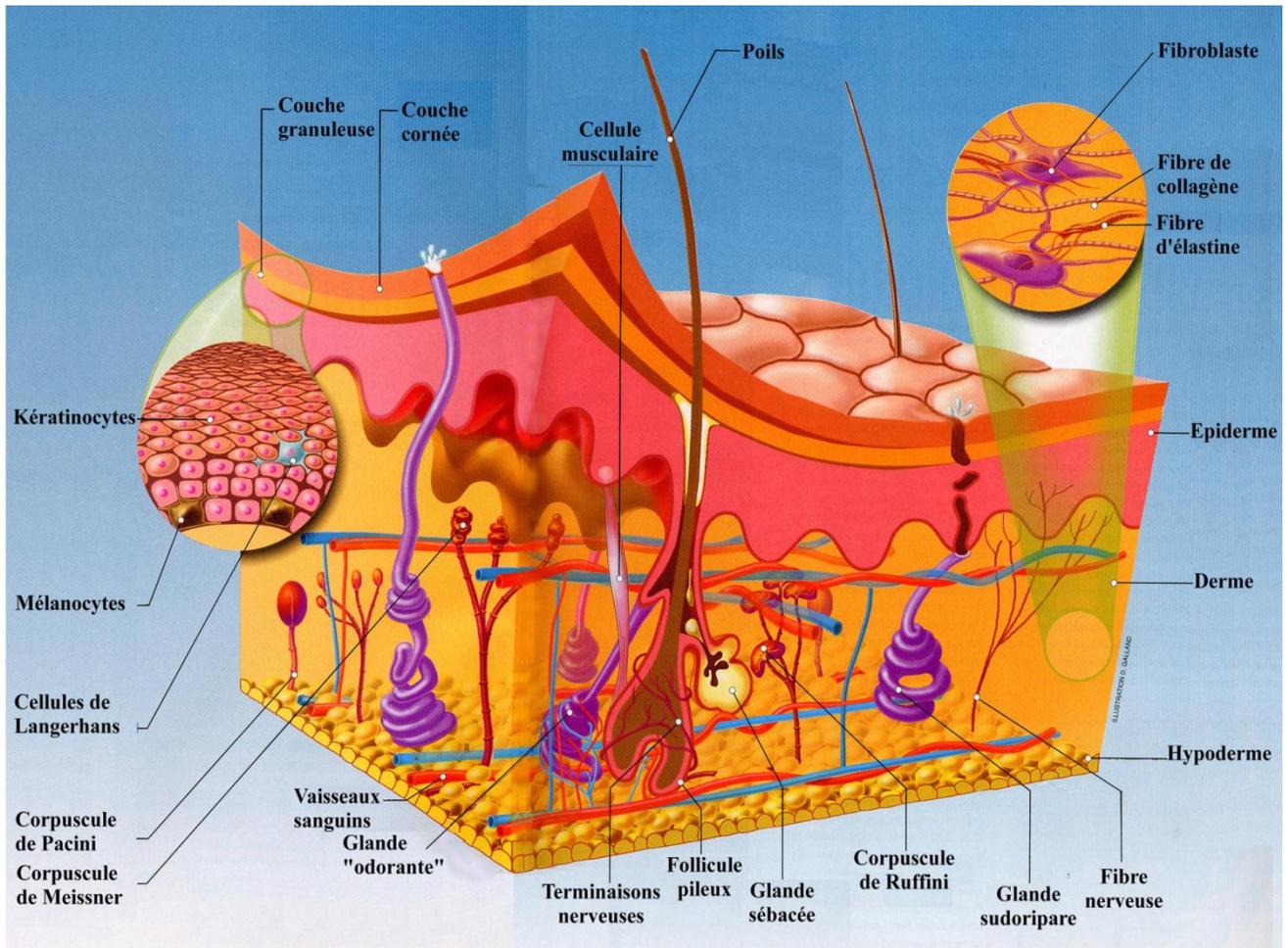


Figure 3 : Structure de la peau (Science & Vie, édition spéciale « Corps Humain », 1999).

### **b.7. Gène *ADAMTS20***

Le gène *ADAMTS20* code pour une métalloprotéase de type désintégrine. Celle-ci est sécrétée par les mélanoblastes pour induire le remaniement de la matrice extracellulaire.

La mutation *Belted (Bt)* affectant ce gène a pour conséquence un défaut de migration des mélanoblastes (Tang 2001; Rao et al. 2003).

## **3. Localisation des mélanocytes**

Au cours de l'embryogenèse, les mélanoblastes migrent vers différents territoires de peuplement définitif. Outre la peau, ils se retrouvent dans différents tissus comme les muqueuses, les méninges, l'oreille interne, l'arbre trachéo-bronchique, l'uvée, les glandes parathyroïdes et le cœur. Selon leurs localisations, les mélanocytes différenciés peuvent jouer des rôles très différents. Chez les mammifères, ils sont classés en deux populations : les mélanocytes « sécrétoires » majoritaires, les produits de sécrétion étant les mélanosomes qu'ils transfèrent aux kératinocytes, et les mélanocytes « continentaux » extra-cutanés qui ne transfèrent pas leurs mélanosomes.

### **a. Mélanocytes cutanés**

La peau constitue l'organe le plus important de l'organisme, en taille et en poids. C'est la première barrière de défense de l'organisme contre les agressions extérieures. Elle est constituée de trois tissus superposés qui sont de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 3). La population mélanocytaire de la peau se répartit en deux compartiments : le compartiment épidermique d'une part et le compartiment folliculaire d'autre part (Kanitakis 1997).

L'épiderme représente 10% du total des cellules de la peau. Il est constitué de 4 types cellulaires différents qui sont les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Ces cellules se répartissent sur 4 couches superposées : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale (Figure 4).

Les mélanocytes épidermiques sont la deuxième population cellulaire de l'épiderme, ils constituent cinq à dix pour cent du total des cellules de cette région. Ils s'intercalent de

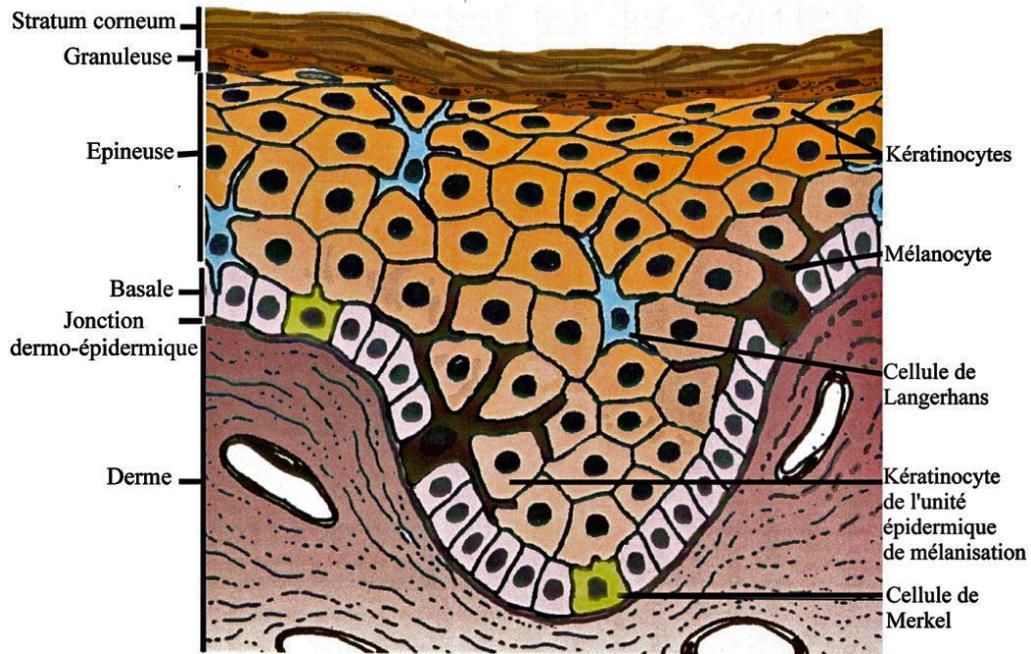


Figure 4 : Structure de l'épiderme (Dominice-Franchi 1999).

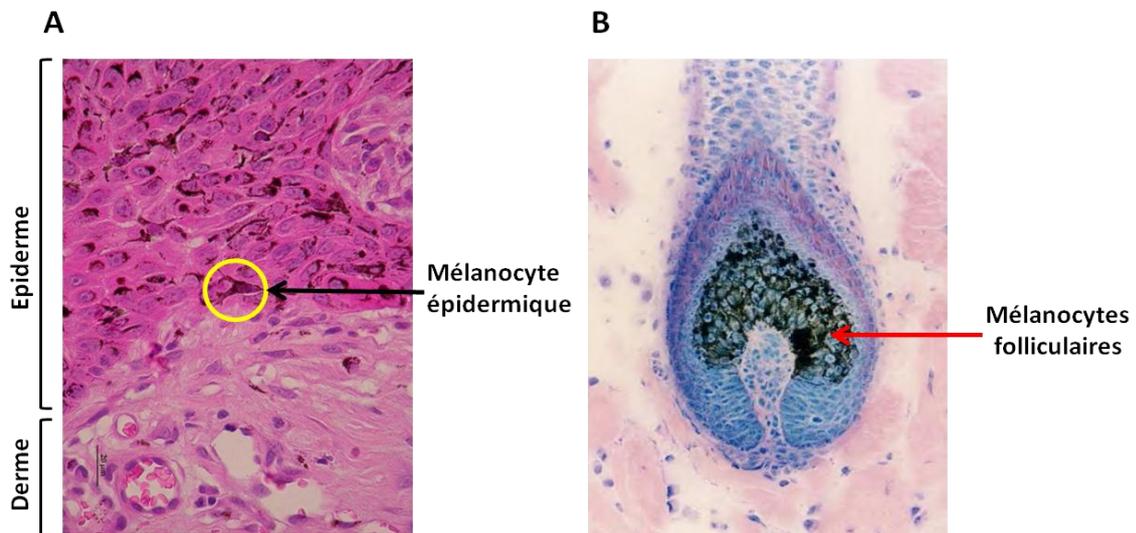


Figure 5 : Localisation des mélanocytes épidermiques (A) et folliculaires (B) (Source : collection d'images de l'unité de dermatologie de l'école nationale vétérinaire de Lyon).

manière régulière entre les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et projettent leurs dendrites entre les kératinocytes de la couche épineuse (Kanitakis 1997).

Les follicules pileux responsables de la production de poils sont des annexes épidermiques, situées dans le derme. Ces annexes sont constituées d'un follicule pileux contenant le poil, d'une glande sébacée, d'une glande sudoripare et d'un muscle arrecteur responsable du hérissément du poil. Le follicule pileux proprement dit est formé de tissu conjonctif périphérique, dérivant du derme, et de tissu épithélial interne, dérivant de l'épiderme.

Les mélanocytes folliculaires ont des propriétés sensiblement différentes de leurs homologues épidermiques (Figure 5). Ils sont plus grands, possèdent des dendrites plus longues et plus ramifiées, et synthétisent des mélanosomes de plus grand format. Des mouvements de mélanocytes peuvent se produire entre les compartiments épidermique et folliculaire (Ortonne and Benedetto 1981). Pour majorité, ces échanges se produisent dans le sens follicule-épiderme notamment en cas d'altération ou de destruction du compartiment épidermique (cicatrisation et re-pigmentation de lésion).

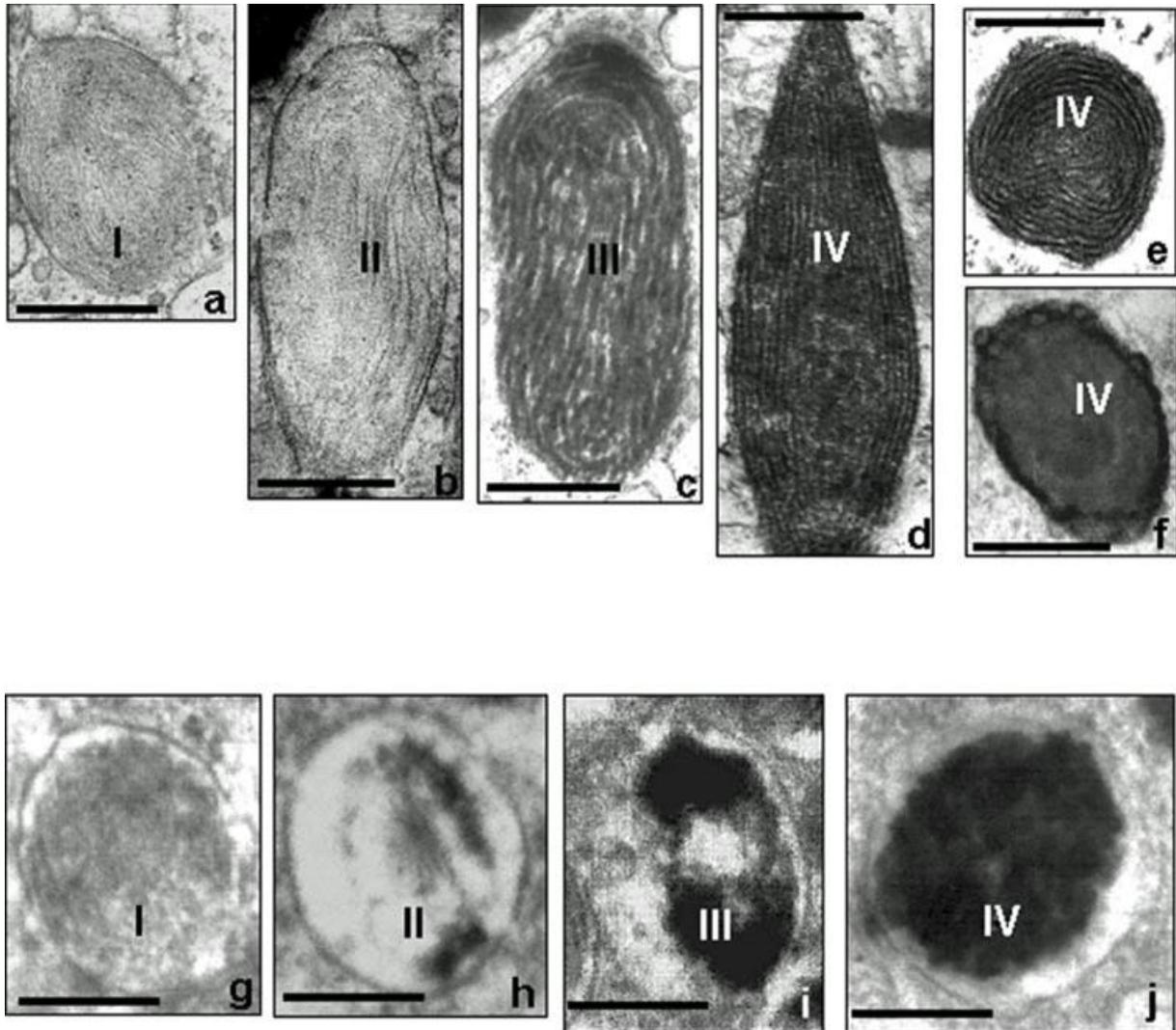
Quel que soit son compartiment de localisation, le mélanocyte cutané est toujours associé à plusieurs kératinocytes *via* ses dendrites, 36 pour les mélanocytes épidermiques et 4 pour les mélanocytes folliculaires (chez l'homme). L'association mélanocyte-kératinocytes forme une unité fonctionnelle que l'on appelle l'unité épidermique de mélanisation (Kanitakis 1997).

## **b. Mélanocytes extra-cutanés**

Les mélanocytes extra-cutanés dépourvus de fonction sécrétoire sont présents dans leur grande majorité au niveau de l'œil (iris, choroïde et épithélium pigmenté de la rétine), de l'oreille interne (strie vasculaire de la cochlée) et des méninges du système nerveux central.

## **4. Mélanogenèse**

La mélanogenèse désigne d'une part, une cascade de réactions aboutissant à la synthèse de différents types de pigments de mélanine et d'autres parts, l'ensemble des mécanismes de contrôles qui gouvernent cette synthèse. Elle se déroule au sein des mélanocytes dans des organites spécialisés appelés mélanosomes. Le processus de mélanisation se déroule en



**Figure 6 : Stades (I, II, III et IV) de la biogenèse des eumélanosomes (a-f) et des phéomélanosomes (g-j) observés en microscopie électronique. Les barres représentent les échelles en  $\mu\text{m}$ . a : 0.20 ; b : 0.23 ; c : 0.24 ; d : 0.22 ; e : 0.20 ; f : 0.35 ; g : 0.23 ; h : 0.26 ; i : 0.26 ; j : 0.30 (D'après Slominski *et al.*, 2004).**

plusieurs étapes aboutissant à la migration et au transfert du mélanosome mature chargé de mélanine aux kératinocytes avoisinants.

### **a. Structure du mélanosome**

Le mélanosome est un organe dont les éléments structuraux et enzymatiques sont assemblés et organisés selon un processus similaire à la formation des lysosomes (Jimbow (Jimbow et al. 2000b), bien que le trafic membranaire soit différent entre ces 2 compartiments (Fujita et al. 2001; Raposo et al. 2001). Ces 2 organites semblent avoir une origine ancestrale commune. Cette hypothèse est soutenue par la spécificité de localisation des protéines Lamp-1,-2 et -3 (Lysosome associated-membran protein) au sein de ces 2 compartiments (Salopek and Jimbow 1996; Jimbow et al. 2000a). Le mélanosome appartient ainsi à cette grande famille des organites apparentés aux lysosomes qui inclus entre autre les granules lytiques des lymphocytes T, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II des cellules présentatrices d'antigènes, les granules des basophiles ou encore les granules azurophiles des neutrophiles et des cellules endothéliales.

En général, la structure du mélanosome dépend du type de mélanine qui est produit dans cet organe. Ainsi il existe deux types de mélanosomes : les eumélanosomes qui synthétisent les pigments d'eumélanine de couleur brune à noir et les phéomélanosomes qui synthétisent les phéomélanines de couleur jaune à rouge (Aqaron 2000). Les eumélanosomes sont de grande taille, de forme elliptique avec une matrice organisée, fibrillaire et lamellaire sur laquelle le dépôt d'eumélanine va se produire (Figure 6).

La synthèse d'eumélanine requiert l'adressage à l'eumélanosome des trois enzymes de la famille des tyrosinases : Tyr, Tyrp1 et Tyrp2 (Slominski et al. 2004).

Les phéomélanosomes ont une forme variable, ils sont de plus petite taille et majoritairement sphériques avec une matrice interne granuleuse renfermant des microvésicules et des fibrilles peu organisées. La protéine Tyr est la seule tyrosinase participant à la synthèse de phéomélanine (Slominski et al. 2004).

Les eumélanosomes et les phéomélanosomes peuvent coexister au sein de la même cellule, cependant la synthèse de leurs pigments respectifs est régulée par un « Switch » c'est-à-dire une synthèse alternative d'eumélanine ou de phéomélanine. Ce principe s'applique aux mélanocytes folliculaires et probablement aux mélanocytes épidermiques (Seiji et al. 1963; Nordlund and Majumder 1997).

## **b. Biogenèse du mélanosome**

La biogenèse du mélanosome se déroule en quatre étapes (Seiji et al. 1963; Kushimoto et al. 2001). Le mélanosome de stade I ou pré-mélanosome est la structure la plus précoce de cette biosynthèse. Il a une forme quasi sphérique et une matrice amorphe (Figure 6). Le mélanosome au stade II acquiert une forme ovoïde allongée avec la formation de la structure interne fibrillaire. A ce stade, la synthèse des pigments de mélanine a déjà débuté au sein des phéomélanosomes. Cette synthèse est évidente au sein des eumélanosomes à partir du stade III et se caractérise par des dépôts de mélanine sur la structure fibrillaire encore visible. Au stade IV, la synthèse de mélanine atteint son maximum, celle-ci recouvre l'intégralité de la structure interne. Tout au long de leur synthèse, les mélanosomes sont transportés aux extrémités dendritiques des mélanocytes où ils sont transférés aux kératinocytes et aux poils en cours de croissance.

Dans certains contextes pathologiques, le processus de biogenèse du mélanosome peut être complètement bouleversé. Dans le cas du mélanome, la synthèse de mélanine peut débiter au stade pré-mélanosome ; on parle alors de mélanosome granulaire en référence à la forme du dépôt d'eumélanine en l'absence de matrice fibrillaire (Jimbow et al. 1984; Bomirski et al. 1988).

## **c. Enzymes régulant la synthèse de mélanine**

La tyrosinase Tyr ainsi que les enzymes Tyrp1/Trp1 (tyrosinase related-protein 1) et Tyrp2/Trp2/Dct (tyrosinase related-protein 2) sont responsables de la synthèse de mélanine au sein du mélanosome. Celles-ci ont une structure très conservée chez différentes espèces et possèdent de fortes similarités entre elles. Ce sont toutes des protéines membranaires de type I avec environ 40% d'acides aminés en commun (Jackson et al. 1991; Slominski et al. 2004). Elles forment entre elles des complexes multimériques (200 à 700kDa) susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de la mélanogenèse (Jackson et al. 1992; Manga et al. 2000) ou dans la synthèse et l'assemblage des structures nécessaires à celle-ci (Slominski and Paus 1990; Manga et al. 2000).

- **La tyrosinase Tyr** est l'enzyme clé du processus de synthèse de mélanine. Elle est codée par le gène *TYR* (Barton et al. 1988). La tyrosinase catalyse 3 réactions distinctes au cours de la synthèse de mélanine (Figure 7) : l'hydroxylation du monophénol (L-tyrosine), la déshydrogénation du catéchol, L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) et du 5,6 dihydroxyindole (DHI) ; La L-DOPA sert de co-facteur dans la première et la troisième réaction (Hearing et al. 1991). Les mutations du gène *TYR* sont responsables pour la plupart, de l'albinisme oculo-cutané de type 1 (AOC 1) (Tomita et al. 1989; Oetting and King 1999). La tyrosinase est délivrée aux mélanosomes sous la forme d'une protéine mature glycosylée de 65 à 75 kDa (Slominski et al. 2004).

- **Tyrp1** est codée par le gène du même nom chez l'homme et par le gène *brown* chez la souris. Les mutations de ce gène sont responsables chez la souris d'une dilution de la couleur du pelage qui passe du noir au marron. Chez l'homme, elles sont responsables de l'albinisme oculo-cutané de type 3 (AOC 3). Tyrp1 serait essentielle uniquement à l'eumélanogénèse car chez la souris, celle-ci n'est pas exprimée dans les cellules à activité phéomélanique (Slominski et al. 1991; del Marmol et al. 1993). Elle serait une protéine de type chaperon qui assisterait la tyrosinase Tyr dans sa fonction. En effet, il est démontré dans le cas de l'AOC 3 que l'absence de protéine Tyrp1 fonctionnelle conduit à un défaut d'adressage de la protéine Tyr qui est envoyée au protéasome pour dégradation (Toyofuku et al. 2001; Kushimoto et al. 2003). Tyrp1 aurait pour rôle la stabilisation de l'activité enzymatique de Tyr et éventuellement le maintien de l'intégrité structurale du mélanosome (Sarangerajan et al. 2001). Dans le processus de synthèse d'eumélanine, Tyrp1 est responsable de l'oxydation de l'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA) en acide indole-5,6-quinone-2-carboxylique (Kobayashi et al. 1994). La protéine complètement glycosylée fait un poids moléculaire de 75kDa (Slominski et al. 2004).

-**Tyrp2** également connue sous le nom de DOPA chrome tautomérase (Dct) est codée par le gène du même nom chez l'homme et par le gène *slaty* chez la souris. Chez cette dernière, les mutations de ce gène sont responsables d'une dilution de la couleur du pelage qui passe du noir au marron-gris. A l'instar de Tyrp1, Tyrp2 serait impliquée dans la synthèse d'eumélanine et pourrait avoir un rôle stabilisateur de l'activité de Tyr. Les enzymes Tyrp1 et Tyrp2 pourraient être des acteurs majeurs de la régulation de la synthèse d'eumélanine et de la stabilisation des structures nécessaires à cette synthèse (Slominski et al. 2004). Le rôle de Tyrp2 dans la survie des mélanocytes a également été démontré (Hearing 2000). Dans le processus de synthèse d'eumélanine, Tyrp2 est responsable de la conversion de la DOPA chrome en DHICA (Tsukamoto et al. 1992; Yokoyama et al. 1994). La protéine Tyrp2

complètement glycosylée fait également un poids moléculaire de 75kDa (Slominski et al. 2004).

## d. Pigments de mélanine

### d.1. Différents types de mélanines

Il existe 5 types de pigments de mélanine dans la nature : l'eumélanine, la phéomélanine, le trichochrome, les mélanines mixtes et la neuromélanine. Ces pigments sont des biopolymères de structures complexes ayant en commun leurs arrangements en plusieurs unités reliées par des liaisons carbone-carbone (C-C) mais différents les uns des autres par leurs compositions chimiques, ainsi que leurs propriétés structurales et physiques (Prota 1992, 1993; Prota and d'Ischia 1993; Prota et al. 1994; Prota 1995; Prota et al. 1995; Ito and Wakamatsu 2003).

- **Les eumélanines** sont à l'origine des couleurs brunes à noires. Elles sont de hauts poids moléculaires, insolubles dans la plupart des solvants (Prota 1992, 1993; Prota and d'Ischia 1993; Prota et al. 1994; Prota 1995; Prota et al. 1995) et fortement associées à des protéines par des liaisons covalentes (Slominski et al. 2004). Les eumélanines sont des copolymères de DHI et DHICA, considérés auparavant comme un ensemble homogène d'homopolymères d'indole-5, 6-quinone. Cette dernière forme correspondrait à de l'eumélanine pure que l'on retrouve uniquement dans l'encre noire des céphalopodes et dans les mélanines synthétisées *in vitro*.

- **Les phéomélanines** sont à l'origine des couleurs jaunes à brun-rouge. Elles ont une composition importante et variable en soufre et en azote (Slominski et al. 2004). La 5-S-cystéinyl DOPA représente leur constituant élémentaire le plus important.

- **Les trichochromes** sont des molécules de faibles poids moléculaires constituées de deux unités de benzothiazine pouvant exister sous forme de tautomères

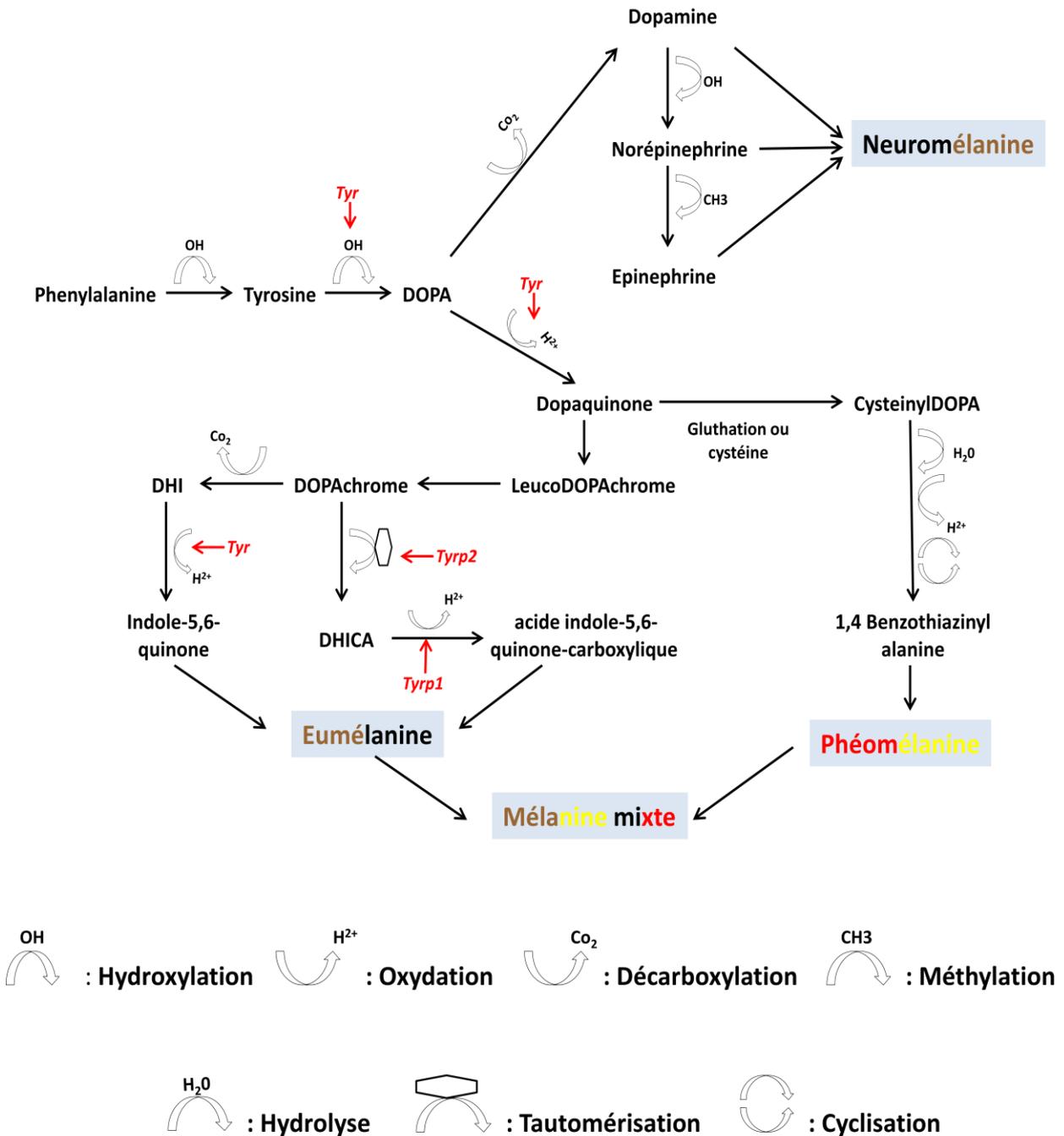


Figure 7 : Voie de synthèse des mélanines (Slominski et al. 2004)

(Prota 1992, 1993; Prota and d'Ischia 1993; Prota et al. 1994; Prota 1995; Prota et al. 1995). Ils sont apparentés aux phéomélanines et leur couleur varie du jaune au rouge.

- **Les mélanines mixtes** correspondent à la majorité des pigments naturels retrouvés chez les mammifères. Leurs structures sont proches de celles des eumélanines mais leurs teneurs en soufre sont importantes. Leurs propriétés physico-chimiques sont intermédiaires entre celles des eumélanines et des phéomélanines. Les mélanines mixtes sont le résultat d'une copolymérisation des précurseurs des phéomélanines et des eumélanines dans des proportions variables (Slominski et al. 2004). Elles peuvent être brunes ou noires.

- **Les neuromélanines** sont spécifiques du système nerveux central. Ce sont des macropolymères composés de quinones cycliques, aminochromes et noradrélinochromes (Carstam et al. 1991; Double et al. 2000). Ils sont à l'origine de colorations noir ou marron. Leurs propriétés communes avec les eumélanines et les phéomélanines sont le pouvoir de chélation des métaux et l'interaction avec des composés organiques ou inorganiques (Lindquist et al. 1987; Zecca et al. 2001).

## d.2. Biosynthèse des mélanines

Les mélanines dérivent toutes de l'oxydation enzymatique de l'acide aminé tyrosine. La biosynthèse de mélanine peut être initiée par l'hydroxylation de la L-phenylalanine en L-tyrosine (étape non obligatoire, appliquée *in vivo*) ou directement à partir de la L-tyrosine qui est hydroxylée en L-DOPA (étape obligatoire *in vivo* et *in vitro*). La L-DOPA sert de précurseur à la fois aux mélanines et aux catécholamines mais selon des voies distinctes (Figure 7). L'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone est une étape commune à l'eumélanogénèse et à la phéomélanogénèse. A partir de cette étape, les voies de formation des eumélanines et des phéomélanines divergent (Slominski et al. 2004).

L'eumélanogénèse implique la transformation de la dopaquinone en leukodopachrome suivi d'une série de réactions d'oxydoréduction non enzymatiques aboutissant à la production du DHI et du DHICA (Pawelek 1991; Ito and Wakamatsu 2003). Sous l'action de la tyrosinase Tyr, le DHI est oxydé en indole-5,6-quinone. C'est suite à la polymérisation de ce composé que se forme la DHI-mélanine, une eumélanine de couleur noire, insoluble et de fort poids moléculaire (Bologna and Orlow 2003). La transformation de la dopaquinone en DHICA est initiée par l'action de Tyrp2 et de cations métalliques divalents (zinc, cuivre...), celle-ci s'oxyde en acide indole-5,6-quinone-carboxylique sous l'action de Tyrp1. La

polymérisation de l'acide indole-5,6-quinone-carboxylique aboutit à la formation de la DHICA-mélanine, une eumélanine marron faiblement soluble (Bologna and Orlow 2003).

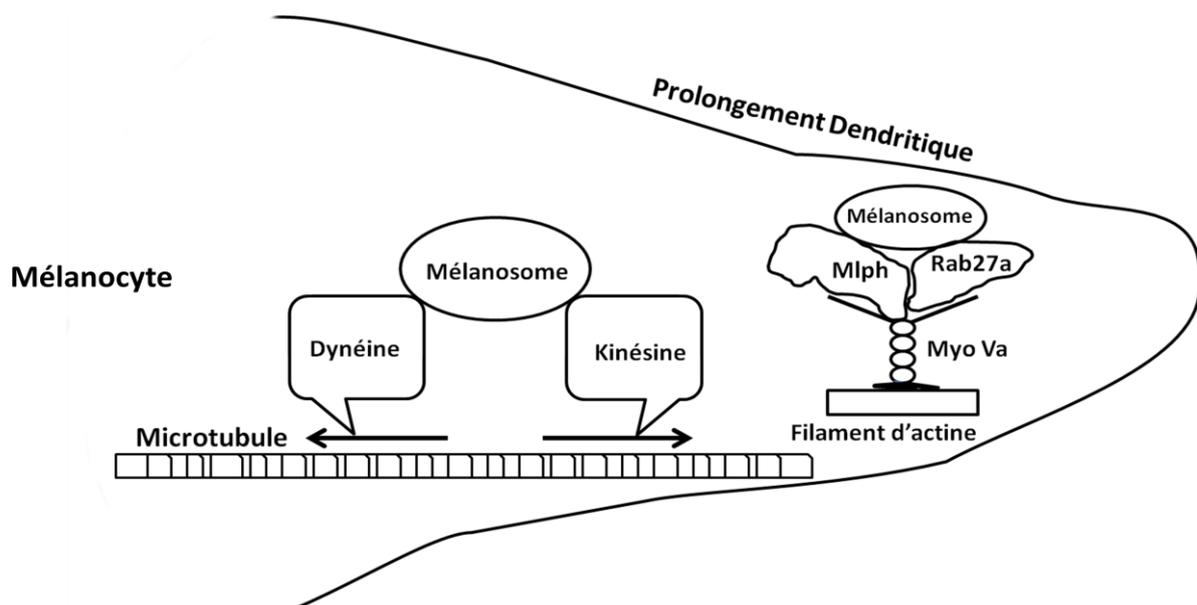
Les phéomélanines et les trichochromes sont générés à partir de cystéinyl-DOPA et de glutathionyl-DOPA résultant de la combinaison de la dopaquinone avec la cystéine ou le glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine) (Prota 1995; Ito and Wakamatsu 2003). Les mélanines mixtes contiennent à la fois des eumélanines et des phéomélanines.

La coloration des téguments chez les mammifères est déterminée par la quantité relative des pigments d'eumélanine et de phéomélanine. Les proportions de synthèse de ces deux mélanines sont régulées, entre autres, par le récepteur de la mélanocortine (Mc1r) dont les mécanismes d'action seront développés dans la partie I.5.

Les catécholamines sont responsables de la synthèse des neuromélanines. Dopamine, norépinephrine et épinephrine résultent respectivement des réactions enzymatiques de décarboxylation, d'hydroxylation et de méthylation de la L-DOPA (Slominski et al. 2004). *In vitro*, ces catécholamines sont capables de former des neuromélanines suite à de multiples réactions d'oxydoréduction (Stepien et al. 1989). *In vivo*, seule la dopamine et la cystéinyl-dopamine peuvent servir de précurseurs primaires à la synthèse de neuromélanine (Carstam et al. 1991; Zecca et al. 2001).

### **d.3. Rôle des mélanines**

Les pigments mélaniques ont pour fonction première la protection de l'ADN cellulaire contre les radiations ultraviolettes (UV) qui peuvent générer des molécules hautement mutagènes de type radicaux libres ou anions superoxydes (Riley 1997). En effet, la combinaison de fonctions carbonyles et le haut degré de conjugaison de ses constituants font de la mélanine un puissant absorbeur de radiations grâce à un spectre d'absorption photonique continu allant de l'ultraviolet à l'infrarouge. L'absence ou la réduction de synthèse de mélanine au niveau de la peau est associée à une sensibilité accrue aux rayonnements UV et à une prédisposition au cancer cutané. Chez les mammifères, ce sont les pigments mélaniques qui confèrent au pelage sa fonction photoprotectrice. Cette coloration du pelage a également pour rôle le camouflage ainsi que la communication sociale et sexuelle.



**Figure 8 : Diagramme schématisé du transport des mélanosomes vers les extrémités dendritiques.** Les mélanosomes liés aux microtubules sont transportés de façon bidirectionnelle à travers le mélanocyte par les moteurs protéiques kinésine (transport antérograde) et dynéine (transport rétrograde). A l'extrémité des dendrites, les mélanosomes se lient au réseau périphérique d'actine par l'intermédiaire de la myosine Va et des protéines de liaison mélanophile (Mlph) et Rab27a (Parks et al. 2009).

La capacité de protection contre les UV est différente en fonction du type de mélanine. Les eumélanines ont une capacité de protection plus importante que les phéomélanines. Ces dernières sont riches en composés soufrés, qui après irradiations peuvent former des radicaux libres, capables d'endommager les cellules épidermiques (Cesarini 1996).

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

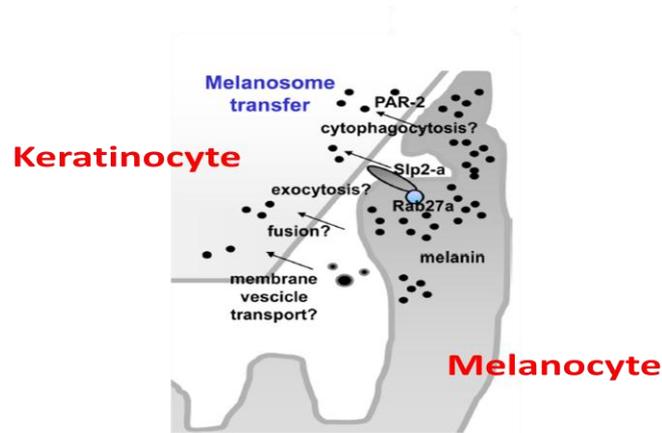
### **e. Transport des mélanosomes**

En même temps que se déroule la synthèse de mélanine au sein du mélanosome, celui-ci est transporté vers les extrémités dendritiques des mélanocytes en vue de son transfert aux kératinocytes des couches basales et supra-basales de l'épiderme ainsi qu'aux kératinocytes immatures du follicule pileux. Le transport des mélanosomes est assuré par deux mécanismes de motilité (Figure 8, Figure 10) : une motilité longue distance acheminant les mélanosomes matures jusqu'aux extrémités dendritiques et une motilité courte distance qui précède le transfert des mélanosomes aux kératinocytes (Marks and Seabra 2001). La motilité longue distance est assurée par le réseau de microtubules tandis que la motilité courte distance est assurée par le réseau périphérique de filaments d'actine subcortical.

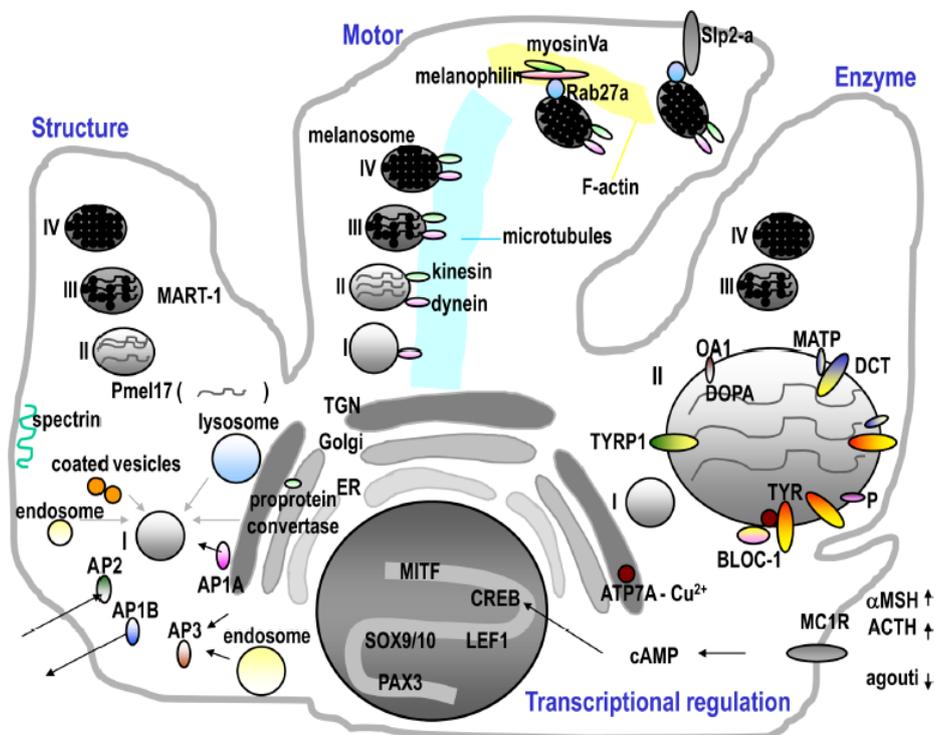
L'acheminement des mélanosomes *via* le réseau de microtubules s'effectue selon des mouvements antérogrades et rétrogrades qui dépendent des protéines motrices cytoplasmiques kinésine et dynéine (Vallee et al. 1988). En fonction de la polarité du microtubule, deux types de mouvements peuvent être envisagés. Dans le cas d'une polarité uniforme, la kinésine assure les mouvements antérogrades et la dynéine le mouvement inverse alors que dans le cas d'une polarité mixte, les deux moteurs protéiques collaborent dans les deux directions. En plus de son rôle dans le transport rétrograde des vésicules cargo, la dynéine est également impliquée dans la fusion endosomale et l'adressage de certains récepteurs (Watabe et al. 2008). La spectrine est une protéine du cytosquelette qui intervient également dans la motilité longue distance. La spectrine se fixe sur tous les systèmes filamenteux et relie les membranes et les protéines du cytosol aux éléments du cytosquelette (De Matteis and Morrow 2000). Celle-ci forme des échafaudages multifonctionnels avec des protéines membranaires,

cytosoliques et certains phospholipides *via* des protéines adaptatrices (AP). Au cours de la biogenèse du mélanosome, spectrine et dynéine coopèrent pour retarder le transport des mélanosomes jusqu'à la fin de leurs approvisionnements en protéines mélanosomiques, indispensables à leurs maturations (Hirobe and Abe 2007a, 2007b; Hirobe et al. 2007b; Hirobe et al. 2007a; Kural et al. 2007). La protéine Palladin et son ligand syntaxine 13 (membre de la famille des SNAREs) sont également susceptibles d'intervenir dans le mécanisme d'approvisionnement du mélanosome.

La myosine Va, la GTPase Rab27a et la Mlph sont les principaux acteurs de la motilité courte distance du mélanosome (Figure 8, Figure 10). Le rôle de la myosine Va a été mis en évidence par l'observation de la dilution du pelage chez les mutants murin *dilute* et chez des patients atteints du syndrome de Griscelli (Griscelli et al. 1978). Cette dilution est due à des mutations touchant la *myosine Va* (Pastural et al. 1997). Ces mutations entraînent un défaut dans le transport des mélanosomes qui malgré une morphologie et une maturation normales s'accumulent dans l'espace périnucléaire. La myosine Va serait impliquée dans la capture des mélanosomes en périphérie et leurs transferts au réseau subcortical d'actine. Chez certains patients atteints du syndrome de Griscelli, des mutations causales ont été observées dans le gène *RAB27A* (mutation *ashen*) codant une GTPase (Menasche et al. 2000). Rab27a serait requis pour la capture des mélanosomes médiée par la myosine Va (Bahadoran et al. 2001; Hume et al. 2001; Wu et al. 2001). Les souris mutantes *leaden* ont un patron de coloration identique à celui des souris *ashen* et *dilute*. Le locus *leaden* code pour la Mlph (Matesic et al. 2001). Les protéines Mlph, Rab27a et myosine Va forment un complexe tripartite qui contrôle le transport distal du mélanosome jusqu'à l'extrémité dendritique (Bahadoran et al. 2003; Kuroda et al. 2003). Mlph joue le rôle d'effecteur en interagissant avec Rab27a et la myosine Va respectivement par ses domaines N et C-terminal (Fukuda and Kuroda 2002; Kuroda et al. 2002; Strom et al. 2002; Wu et al. 2002). Rab27a se lie également avec la synaptoagmin-like protein-2-a (SLP2-a), un régulateur supposé de l'exocytose des mélanosomes car cette interaction aboutit à l'amarrage du mélanosome à la membrane plasmique (Kuroda and Fukuda 2004).



**Figure 9 : Modes de transfert des mélanosomes aux kératinocytes** (Yamaguchi and Hearing 2009).



**Figure 10 : Facteurs impliqués dans la mélanogénèse** (Yamaguchi and Hearing 2009). Le schéma montre les différents facteurs impliqués dans la structure du mélanosome (à gauche), dans le transport (au milieu), les enzymes (à droite) et les facteurs de transcription (en bas). OA 1 est un récepteur couplé aux protéines G localisé sur la membrane du mélanosome qui a pour agoniste sélectif la L-DOPA (Lopez et al. 2008). La protéine P dont les mutations sont responsables de l'OCA 2 et la protéine Membran Associated Transporter Protein (MATP) responsable de l'OCA 4 affecte respectivement l'adressage de Tyr et Tyrp1 (Costin et al. 2003). Le transporteur de cuivre ATP7A et Tyr sont co-localisés de manière transitoire au niveau du trans-Golgi (TGN) et cohabitent au sein du mélanosome. Le « trafficking » de ces composés jusqu'au mélanosome dépend du complexe Biogenesis of Lysosome-related Organelles complex (BLOC-1) (Moriyama and Bonifacino 2002). Les protéines adaptatrices régulent également le trafic de ces protéines au sein du TGN et de l'endosome (Feng et al. 1999). MART-1 est une protéine de type chaperon qui influence l'expression, la stabilité et l'adressage de Pmel17 (Hoashi et al. 2005).

## f. Transfert des mélanosomes aux kératinocytes

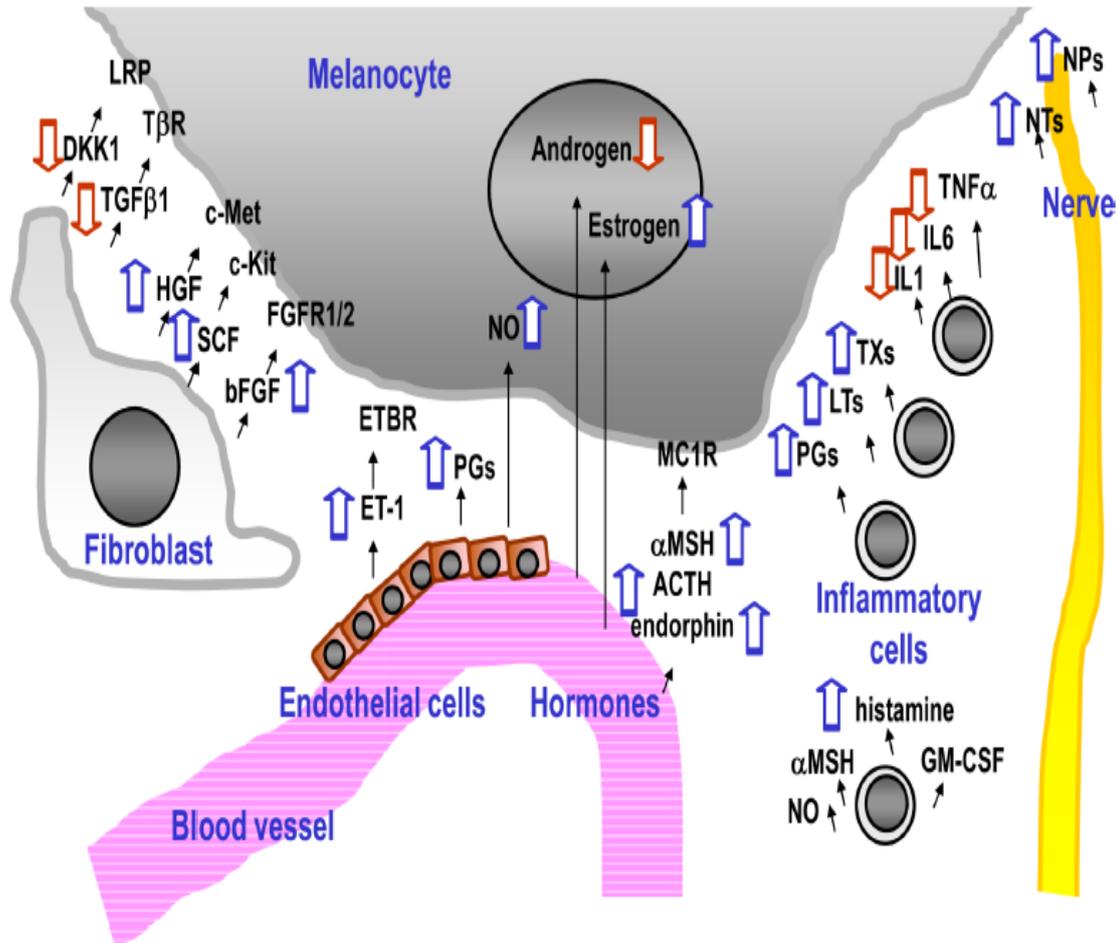
Les données acquises sur les mécanismes de transfert des mélanosomes et/ou de mélanines aux kératinocytes proviennent pour la plupart d'études de co-cultures des deux types cellulaires (Scott et al. 2002). Quatre modes de transfert des mélanosomes ont été proposés (Figure 9). Le premier implique la phagocytose des extrémités dendritiques par les kératinocytes ; le second met en jeu le transfert physique des mélanosomes *via* un pore de communication intercellulaire appelé filopode (Scott et al. 2002); le troisième implique l'exocytose des mélanines par le mélanocyte suivie de l'endocytose par les kératinocytes

(Van Den Bossche et al. 2006); le quatrième mécanisme implique l'export des mélanosomes *via* des vésicules membranaires qui sont intégrées aux kératinocytes soit par fusion membranaire soit par phagocytose (Van Den Bossche et al. 2006).

Le mécanisme de transfert des mélanosomes par exocytose est le plus classique et également le plus attrayant. Les mélanosomes étant des organites apparentés aux lysosomes, il est tentant d'émettre l'hypothèse d'un mécanisme d'exocytose régulé et analogue entre ces deux organites. Les longues demi vies observées pour les protéines membranaires intégrales du mélanosome de stade IV (Kobayashi et al. 1998; Halaban et al. 2001) laissent supposer le recyclage de celles-ci dans les mélanosomes nouvellement formés. Seul le mécanisme d'exocytose suivi d'endocytose permet ce recyclage, par contre les autres modes de transfert requièrent un « *turn-over* » continu de ces protéines, étant donné que la membrane du mélanosome est transmise au kératinocyte (Marks and Seabra 2001).

De nombreux facteurs impliqués dans le mécanisme de transfert des mélanosomes ont été identifiés. Par exemple, Protéinase-activated receptor 2 (Par-2) est un récepteur activé par les sérines protéases présentes sur la membrane des kératinocytes. L'activation de Par-2 augmente le niveau de phagocytose des kératinocytes et stimule la formation des dendrites mélanocytaires (Seiberg et al. 2000a, 2000b; Sharlow et al. 2000; Paine et al. 2001; Scott et al. 2004). L'expression de Par-2 est régulée par de nombreux facteurs physiologiques comme Dickkopf1 (DKK1), un inhibiteur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Glinka et al. 1998).

Les glycoprotéines de surface comme les cadhérines jouent un rôle majeur dans l'adhésion mélanocyte-kératinocyte. E-cadhérine et P-cadhérine permettent l'adhésion des mélanocytes aux kératinocytes médiée par le calcium. Certains récepteurs comme les lectines sont également impliqués dans l'adhésion mélanocyte-kératinocyte. Ces lectines se fixent sur des sucres présents dans les espaces inter-membranaires (Van Den Bossche et al. 2006).



**Figure 11 : Régulation de la mélanogénèse par des facteurs dérivés des fibroblastes, du sang, des intermédiaires de l'inflammation et des cellules nerveuses.**(Yamaguchi and Hearing 2009). Les régulations positives et négatives sont indiquées respectivement par des flèches bleues et rouges. Les androgènes sont susceptibles de réguler la mélanogénèse dans les deux sens. DKK1 et Transforming Growth Factor- β1 (TGFβ1) sont les seuls facteurs dérivés des fibroblastes responsables d'une diminution de la pigmentation. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF) et SCF sont des activateurs de la mélanogénèse également sécrétés par les kératinocytes (Yamaguchi et al. 2007). D'autres facteurs responsables de régulations négatives de la mélanogénèse comme l'interleukine 1 (IL-1), IL-6 et le Tumor Necrosis Factor-α (TNFα) dérivent des cellules inflammatoires.

La présence de protéines SNARE et Rab3a sur les membranes des mélanosomes et la présence de complexes SNARE sur la membrane des mélanocytes suggèrent que celles-ci pourraient jouer un rôle à la fois dans l'adressage des mélanosomes à la membrane plasmique et dans le transfert des mélanosomes aux kératinocytes (Scott and Zhao 2001).

### **g. Dégradation des mélanosomes**

La dégradation des mélanosomes se produit dans les mélanophagolysosomes intrakératinocytaires, qui sont le produit de la fusion des lysosomes et des mélanosomes. Dans ces compartiments, les mélanosomes sont dégradés par les enzymes lysosomales. Les résidus issus de cette dégradation sont éliminés avec les couches superficielles de l'épiderme lors de la desquamation.

## **5. Régulation de la mélanogenèse**

Les principaux acteurs de la régulation de la mélanogenèse sont les mélanocytes qui synthétisent les pigments de mélanine et les kératinocytes qui reçoivent et distribuent ces pigments dans les couches supérieures de la peau (Yamaguchi et al. 2007). Cette régulation est également assurée par une multitude de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont les fibroblastes dans le derme qui interagissent avec les mélanocytes et les kératinocytes qui leurs sont superposés, les facteurs endocriniens véhiculés par le sang, ainsi que les médiateurs de l'inflammation et les facteurs neuronaux (Yamaguchi and Hearing 2009) (Figure 11). Les facteurs extrinsèques sont surtout les rayonnements UV qui sont les principaux stimulants de la mélanogenèse.

Les hormones mélanotropes hypophysaires et leurs récepteurs sont les acteurs fondamentaux de la régulation de la mélanogenèse. Celles-ci sont l'adrenocorticotrophique hormone (ACTH), le Melanocortin Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH), le  $\beta$ -MSH et, peut-être, le  $\gamma$ -MSH. Les peptides MSH et ACTH partagent un hexapeptide (Tyr-Met-x-His-Phe-Arg-Trp) qui contient le térapeptide His-Phe-Arg-Trp indispensable à l'activité mélanotropique (Slominski et al. 2004). Toutes ces hormones résultent du clivage de la proopiomélanocortine (POMC) par des prohormones convertases (PCs). La production cutanée de POMC et des produits de son clivage l'ACTH et l' $\alpha$ -MSH, a lieu majoritairement au niveau des kératinocytes et des mélanocytes (Slominski et al. 2004; Rousseau et al. 2007). L'ACTH et

l' $\alpha$ -MSH agissent en se fixant sur le récepteur Mc1r. Ce récepteur est codé par le gène *Extension (E)* (Tamate and Takeuchi 1984; Robbins et al. 1993; Suzuki et al. 1996). Il appartient à une famille de cinq récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Chhajlani and Wikberg 1992; Mountjoy et al. 1992; Gantz et al. 1993b; Gantz et al. 1993a; Roselli-Reh fuss et al. 1993; Labbe et al. 1994). La liaison de l' $\alpha$ -MSH sur Mc1r entraîne l'activation d'une adénylate cyclase et l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (Adénosine Mono Phosphate cyclique) (Suzuki et al. 1996). La stimulation de la voie de l'AMPc aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription cAMP Response Element Binding Protein (CREB). Le facteur CREB stimule l'expression du facteur de transcription Mitf en présence du facteur Sox10 dans les mélanocytes (Huber et al. 2003) (Figure 2). Le facteur Mitf, spécifique de la lignée mélanocytaire, active les gènes centraux de la mélanogénèse : *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *MART1* et *PMEL17* (Goding 2000; Du et al. 2003), conduisant à la synthèse d'eumélanine (Figure 2).

Le gène *EXTENSION (E)* chez la souris détermine la quantité et la distribution des pigments d'eumélanine et de phéomélanine à travers ses actions sur les mélanocytes des follicules pileux (Silvers 1979). L'allèle dominant  $E^D$  du gène *extension* provoque une activation constitutive du récepteur Mc1r, ce qui a pour conséquence une augmentation de la synthèse d'eumélanine, donc un pelage noir.

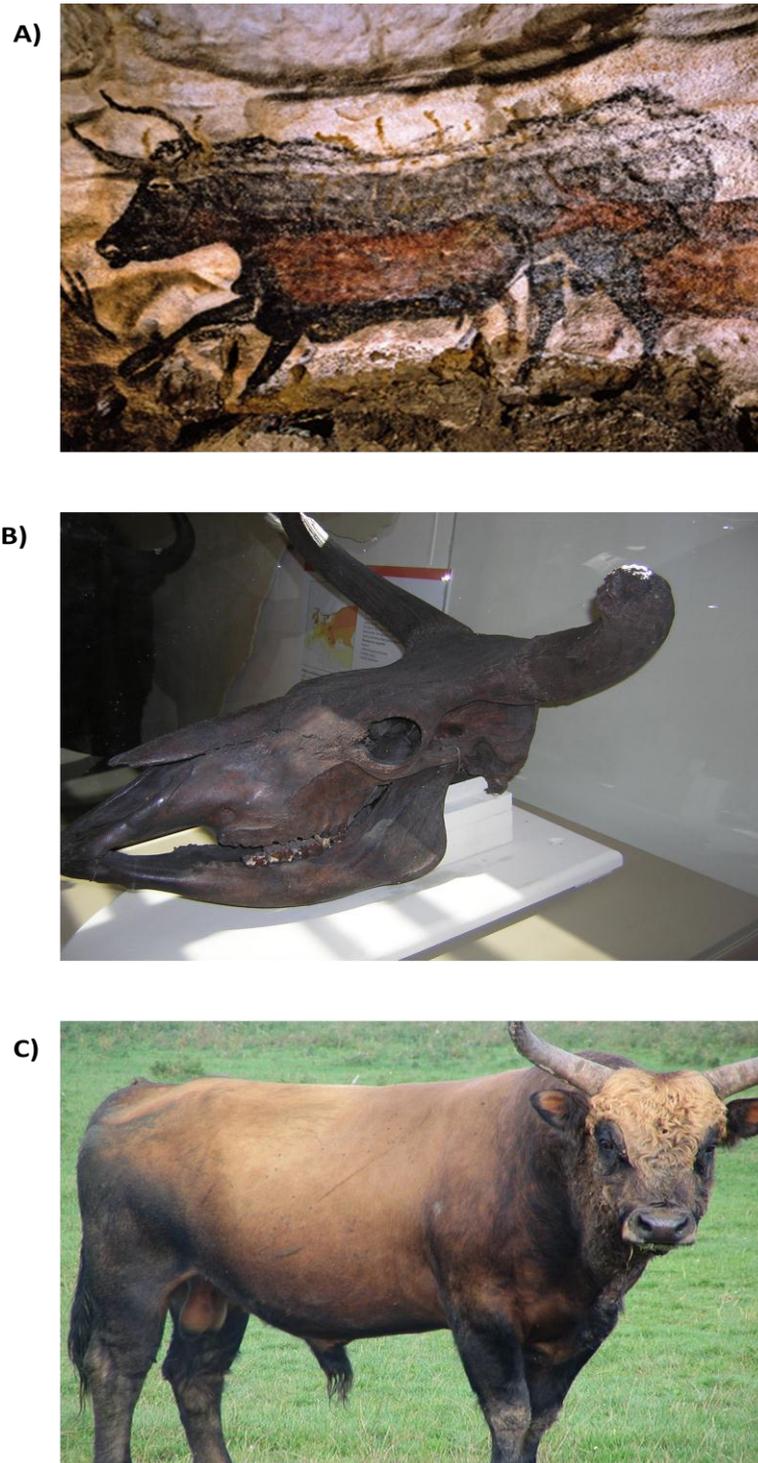
L'allèle récessif ( $e$ ) code un récepteur non fonctionnel empêchant la stimulation de l'expression des acteurs de la mélanogénèse, ce qui a pour conséquence une coloration jaune du pelage (Bennett and Lamoreux 2003).

La commutation ou « switch » entre eumélanogénèse et phéomélanogénèse est assurée par le récepteur Mc1r (Tamate and Takeuchi 1984; Cone et al. 1996) par l'intermédiaire de ses ligands  $\alpha$ -MSH et ASP (Figure 10). La protéine de signalisation ASP est un antagoniste qui entre en compétition avec l'agoniste  $\alpha$ -MSH et l'empêche de se fixer sur Mc1r (Siegrist et al. 1997; Suzuki 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 gène *AGOUTI* générant une surexpression d'ASP, entraînent une coloration jaune du pelage, des anomalies du développement et de l'obésité (Jones et al. 1996).

L'action pigmentogène des rayons UV est le résultat d'un phénomène de régulation paracrine faisant intervenir les kératinocytes. En effet, les UV augmentent la synthèse de POMC par les kératinocytes et inhibent l'expression de la néprilysine, peptidase qui clive et inactive l' $\alpha$ -MSH et l'ACTH. Les rayons UV vont également augmenter l'expression des

récepteurs de l' $\alpha$ -MSH. Chez l'homme, l'administration systémique d' $\alpha$ -MSH, de  $\beta$ -MSH ou d'ACTH stimule le brunissement de la peau principalement au niveau de zones exposées au soleil (Lerner 1961; Levine et al. 1991).

L' $\alpha$ -MSH peut augmenter la synthèse de mélanine par des mécanismes indépendants de l'activation de son récepteur Mc1r. Par exemple, en se fixant sur la 6(R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine (6BH4), une molécule qui inhibe l'activité de la tyrosinase, l' $\alpha$ -MSH anule les effets de cette inhibition, favorisant ainsi la synthèse de mélanine (Schallreuter et al. 1999).



**Figure 12 : Représentations de l'aurochs, *Bos primigenius*** A) Peinture de bovidés datant du paléolithique, présent sur les parois de la grotte de Lascaux, B) Crâne d'aurochs : le crâne était volumineux, avec un front plat et étroit muni de grandes cornes pouvant atteindre 120 cm de longueur, C) Aurochs reconstitué issu de sélections de races bovines domestiques « rustiques » visant à recréer le type originel sauvage *Bos primigenius*. En terme de ressemblance, le résultat n'a été que partiel. L'apparence physique est rustique mais la taille reste inférieure à celle de l'aurochs sauvage, les cornes sont souvent nettement plus petites et la couleur est souvent plus claire.

## II. LOCI IMPLIQUES DANS LA COLORATION DES RACES BOVINES

Les colorations des robes des bovidés ont toujours été une source de fascination pour l'homme. Les peintures rupestres de bovidés présentes sur les parois de la grotte de Lascaux témoignent de cet intérêt préhistorique (Figure 12). C'est vers le XVII<sup>ème</sup> siècle que les sélectionneurs ont commencé à produire des bovins *Bos taurus* avec des robes possédant des profils de couleurs et de tâches plus ou moins uniformes, comme un outil pour l'identification des races.

L'étude de caractères phénotypiques et de leurs variations requiert un référentiel qui souvent désigne le phénotype sauvage. Dans le cas de la pigmentation des bovins, le type sauvage correspond à la robe fauve (rouge/brune) presque noire (brune/noire) de l'aurochs (Figure 12), unique ancêtre de la plupart des races bovines européennes (Olson 1999). L'aurochs, *Bos primigenius* était un animal sauvage rustique, très résistant au froid et à l'humidité et de grande taille (2 m au garrot). Venu d'Eurasie, il s'installe en Europe à la fin de l'ère cénozoïque, juste avant la grande période de glaciation. La robe de l'aurochs n'était pas uniforme, celle-ci présentait des variations de coloration au niveau des extrémités (tête, nuque, patte et postérieur) qui étaient plus sombres. De plus, les mâles avaient une robe plus sombre comparée à celle des femelles. De la même façon, les animaux présentant un phénotype de couleur sauvage ont tendance à avoir les extrémités plus sombres. La plupart des variants par rapport au type sauvage sont rouges ou noirs uniformes. Les autres types de coloration correspondent à de simples modifications de proportion des trois couleurs principales : noire, rouge/brun (sauvage) et rouge. En général, les variations de coloration peuvent correspondre à des dilutions d'une de ces couleurs ou voir même une disparition totale. La robe du bovin peut être simple, composée ou modifiée. Une robe est dite simple lorsqu'elle est la conséquence d'un seul pigment ; composée lorsqu'elle présente des charbonnures ou des bringeures ; et modifiée, lorsque la robe de base éventuellement charbonnée ou bringée subit une modification telle que le grisonnement, la bigarrure ou la panachure. Ainsi, un bovin peut être de coloration blanche, blonde, froment, brune, rouge, noire, grise, pie rouge, pie noire, pie bleue (Etc...) et même tricolore. Pour expliquer les variations de coloration entre les races, plusieurs loci sont proposés. La combinaison d'allèles des gènes impliqués dans la coloration démontrée ou putatifs aux différents loci permet d'expliquer ces différences phénotypique (Table 1).

Déterminisme moléculaire		Nom	Allèles	Description	Rapport de dominance	Exemples
E	Mc1R	<i>Extension</i>	<i>E<sup>D</sup></i>	Noir uniforme	Dominant	Prim'Holstein
			<i>E<sup>+</sup></i>	Brun/noir- extrémités sombres	Dominant	Jersey
			<i>e</i>	Rouge	Récessif	Limousine
A	ASP	<i>Agouti</i>	<i>A<sup>bp</sup></i>	Modificateur du type WT, entièrement noir	Dominant /E+ Hypostatique/E <sup>D</sup>	Prim'Holstein
			<i>a<sup>w</sup></i>	Perte du rouge et distribution uniforme du noir	Récessif	Brown Swiss
			<i>a<sup>i</sup></i>	Perte du rouge sur la colonne vertébrale	Récessif	Chianina
			<i>A<sup>br</sup></i>	Bande irrégulière noir sur fond brun/rouge	Dominant sur l'absence de bringeur	Normande
<i>Dc</i>	Pmel17	<i>Dilution Charolais</i>	<i>Dc/Si</i>	Dilution du noir en gris clair, dilution du rouge en jaune clair	Dominant	Charolais
<i>Ds</i>	Pmel17	<i>Dilution Simmental</i>	<i>Ds/Si1</i>	Dilution modérée du noir et du rouge	Dominance incomplète	Simmental
<i>Dn</i>	-	<i>Dun</i>	<i>Dn</i>	Disparition de la pigmentation rouge	Dominance incomplète	Highland
S	c-KIT	<i>Spotting</i>	<i>S<sup>H</sup></i>	Herford pattern/ face, queue, pieds blancs	Dominance incomplète	Herford
			<i>S<sup>P</sup></i>	Pinzgauer pattern/côtés pigmentés, zones blanches sur le dos et le ventre	Dominance Incomplète	Pinzgauer
			<i>s</i>	Piebald: zones irrégulières pigmentées et blanches	Récessif	Prim'Holstein
<i>R</i>	MCF	<i>Roan</i>	<i>R</i>	Combinaison de poils blancs et pigmentés	Dominance incomplète	Shorthorn
<i>Bt</i>	c-KIT	<i>Belting</i>	<i>Bt</i>	Ceinture blanche	Dominant	Galloway
<i>Bl</i>	-	<i>Blaze</i>	<i>Bl</i>	Tête blanche	Dominance incomplète	Simmental
<i>Bc</i>	c-KIT	<i>Brockling</i>	<i>Bc</i>	Zone pigmentées dans les parties blanches des mutants white-spotted	Dominant	Shorthorn
<i>Cs</i>	c-KIT	<i>Colour-sided</i>	<i>Cs</i>	Pigmentation uniquement au niveau des flancs	Dominant	Texas Longhorn

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

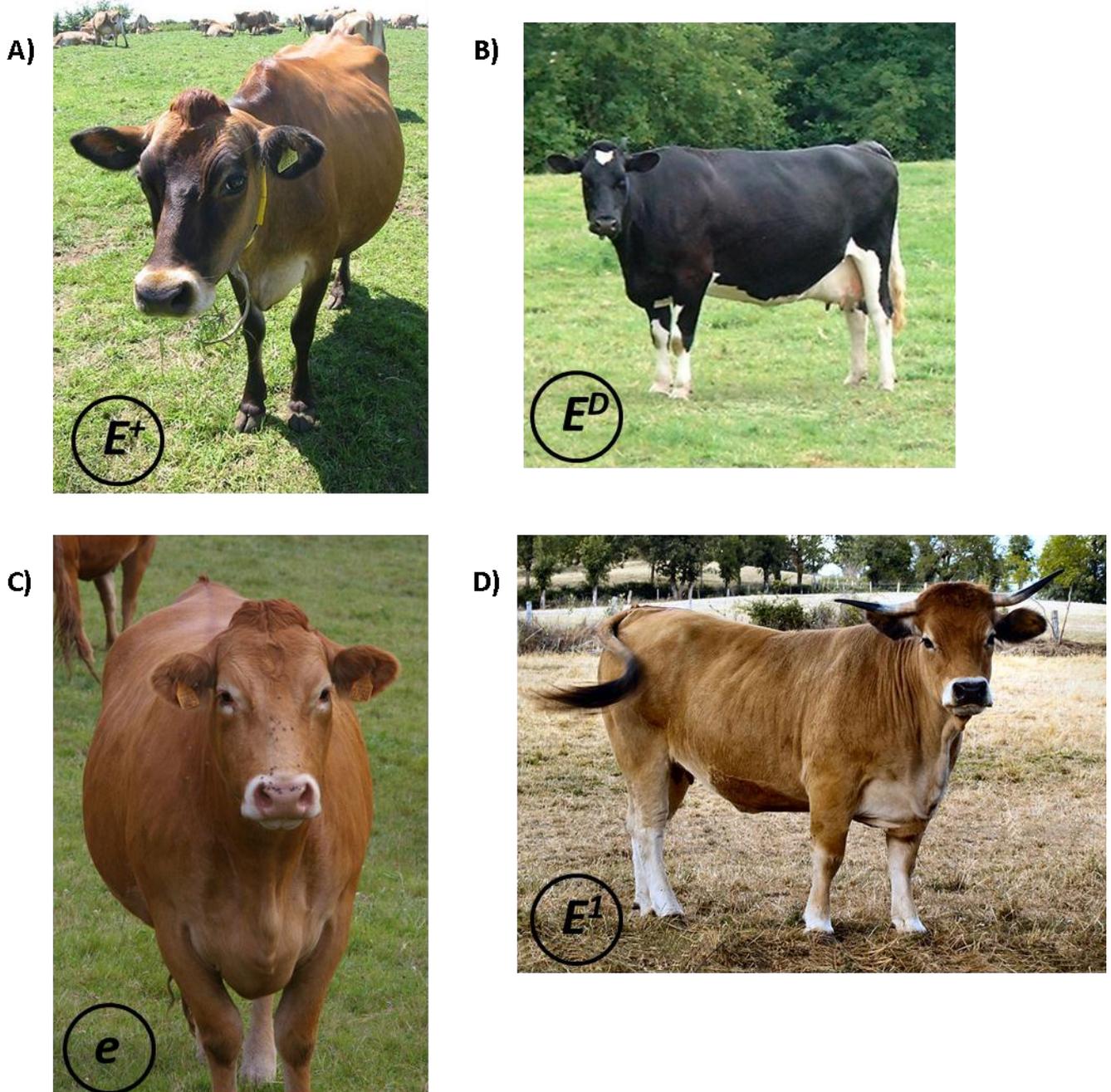
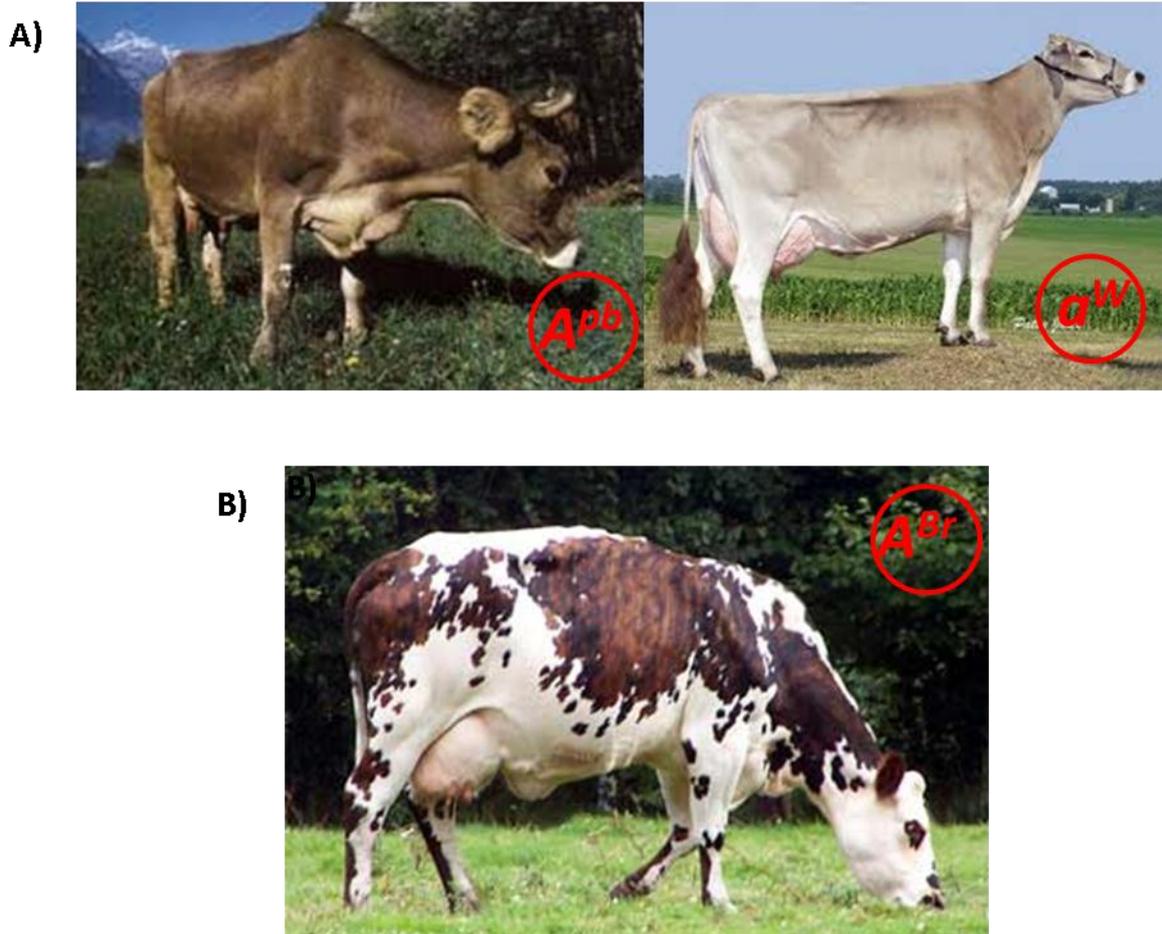


Figure 13 : Exemples de bovins portant les différents allèles définis pour le gène *EXTENSION*. A) Vache de race Jersey, B) Vache de race Prim'Holstein, C) Vache de race Limousine, D) Vache de race Aubrac.

## 1. Gène *EXTENSION*

Le gène *EXTENSION* code pour le facteur responsable de la majeure partie des variations de coloration observée chez les races bovines. Localisé sur le chromosome 18, il code pour le récepteur Mc1r des hormones mélanocortines (Robbins et al. 1993; Klungland et al. 1995). Ce gène existe sous trois formes alléliques:  $E^D$ ,  $E^+$  et  $e$ . L'allèle  $E^D$  engendre un phénotype noir à transmission dominante,  $E^+$  est l'allèle sauvage permettant toutes les combinaisons du rouge au rouge/brun et noir, et  $e$  est l'allèle rouge récessif. Le rapport de dominance de ces allèles est :  $E^D > E^+ > e$ . Le récepteur Mc1r codé par la forme allélique sauvage  $E^+$  peut être stimulé par l'agoniste  $\alpha$ -MSH et inhibé par l'antagoniste Agouti pour produire différentes quantités d'eumélanine et de phéomélanine respectivement. L'allèle  $E^D$  porte une substitution, d'une Thymine par une Cytosine en position 296 de la partie codante du gène *EXTENSION*, ce qui se traduit par la substitution de l'acide aminé leucine en position 99 par une proline (Klungland et al. 1995). Cette mutation ponctuelle rend Mc1r constitutivement actif ce qui stimule la production d'eumélanine par l'intermédiaire de la tyrosinase. L'allèle  $E^D$  produit par exemple, le phénotype noir observé chez la race Prim'Holstein (Figure 13). L'allèle  $e$  se caractérise par un changement du cadre de lecture due à la délétion d'une Guanine en position 310, ce qui produit une protéine tronquée (Klungland et al. 1995; Joerg et al. 1996). Chez les individus portant cet allèle, le récepteur Mc1r ne peut pas être stimulé ; cependant la phéomélanine continue d'être produite dans les mélanocytes. Cet allèle est retrouvé entre autres chez les races Limousine, Blonde d'Aquitaine et Charolaise. Un quatrième allèle  $E^I$  contenant une insertion de 12 paires de bases en position 669 de la partie codante a été identifié chez les races Gasconne et Aubrac (Rouzaud et al. 2000). Cette mutation conduit à une duplication de quatre acides aminés dans la troisième boucle cytoplasmique du récepteur, connue pour interagir avec les protéines G. Cet allèle est responsable d'une augmentation plus importante du niveau intracellulaire d'AMPc comparé à l'allèle sauvage  $E^+$ , sans qu'il n'y ait d'incidence sur le rapport eumélanine/phéomélanine entre les animaux portant chacun l'un des deux allèles (Graphodatskaya et al. 2002).



**Figure 14 : Exemples de bovins portants différents allèles définis pour le gène *AGOUTI*.  
A) Vaches de race Brown Suisse (Brunes des Alpes), B) Vache de race Normande.**

## 2. Gène *AGOUTI*

Les mutations au locus *AGOUTI* bovin restent très peu connues en dépit de recherches réalisées par différents auteurs (Lauvergne and Ollivier 1966; Searle 1968; Olson 1982; Adalsteinsson et al. 1995). A ce jour, la plupart des allèles bovins ont été désigné par rapport aux allèles connus chez d'autres espèces ayant des similarités phénotypiques avec des races bovines. Les mutations décrites dans le gène *AGOUTI* conduisent à une modification de l'expression du profil de coloration sauvage ( $E^+$ ). Ce gène existe sous 6 formes alléliques :  $A^+$ ,  $a$ ,  $A^{pb}$ ,  $a^i$ ,  $a^w$  et  $A^{br}$ . L'allèle *Agouti*  $A^+$  sauvage, permet à la fois l'expression de pigments rouge et noir (Olson 1999), de même que l'allèle récessif  $a$  ; par contre ce dernier à l'état homozygote produit un pelage noir uniforme (Adalsteinsson et al. 1995). L'allèle  $a$  n'aurait aucune influence sur la coloration en présence des génotypes ( $e/e$ ) ou ( $E^D/-$ ). Une modification du phénotype sauvage se traduisant par une augmentation de la coloration noire sur presque tout le corps de l'animal, est attribuée à l'effet de l'allèle *Agouti*  $A^{pb}$  (patterned blackish (Tableau 1) (Majeskie 1970). Le génotype  $A^{pb}/A^{pb}$  insensible aux effets du sexe sur la coloration, serait probablement responsable du profil de coloration noire observé chez les races Jersey (Figure 13), Brown Swiss (Brune des Alpes) (Figure 14) ou Prim'Holstein (Olson 1999). L'allèle récessif  $a^i$  pourrait être responsable de la coloration plus claire du ventre des races Limousine et Jersey (Figure 13, Tableau 1). Les modifications du profil de coloration sauvage rencontrées chez la race Brown Swiss correspondant à une perte de pigmentation rouge et un ventre blanc, sont attribuées à l'allèle  $a^w$  (White-bellied). L'allèle  $A^{br}$  et sa mutation sont bien étudiés, il a été identifié chez la race Normande (Figure 14). L'allèle  $A^{br}$  correspond à l'insertion d'un élément transposable (LINE) dans la région située entre le promoteur et l'exon 1 du gène *AGOUTI*. Cet allèle est associé à la bringueure (brindle) de la race Normande (Girardot et al. 2006). Ces bringueures sont également observées chez les races Texas Longhorn et Dolafe. Le phénotype de bringueure correspond à la présence de bandes noires verticales irrégulières sur tout le corps de l'animal ou parfois confinées à la tête, au cou et au postérieur. La couleur du fond (entre les bandes) varie en fonction des allèles des autres gènes. L'expression phénotypique de l'allèle  $A^{br}$  requiert un allèle sauvage du gène *Mc1r* ( $E^+/E^+$  ou  $E^+/e$ ). Le gène *Agouti* est 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 bringueure. De plus, l'allèle  $A^{br}$  est incapable de modifier la couleur noire du pelage due à l'allèle  $E^D$  (Girardot et al. 2006).

A)



B)



**Figure 15 : Exemples de bovins portant l'allèle hypothétique *dn* du gène *DUN*.  
A) Vache et veau de race Brahman, B) Taureau de race Chianina.**

### 3. Gène *ALBINO*

Les mutations dans le gène *C*, responsables de l'albinisme, sont très répandues chez les mammifères mais demeurent occasionnelles chez les races bovines. La principale caractéristique de ces mutations est la dépigmentation partielle ou totale de la peau, de la robe et des yeux. Les animaux mutés dans le gène *ALBINO* (*c/c*) sont ni conservés ni utilisés en reproduction, en raison d'une très grande sensibilité à la lumière particulièrement au niveau des yeux, due à l'absence de pigments protecteurs dans la rétine. Cependant, des cas d'albinisme ont été décrits en détail chez la race Frisonne Pie Noire (Prim'Holstein) et Brune des Alpes (Weber et al. 1964). L'albinisme décrit chez la race Frisonne Pie Noire est partiel car chez ces animaux, une coloration grisâtre se développe au niveau de l'iris avec l'âge. En plus, au niveau des tâches normalement noires de la robe, on observe un profil de coloration particulier appelé « ghost pattern » (« profil d'ombre »); le déterminisme semble être de type autosomal récessif (Cole et al. 1934; Petersen et al. 1944). D'autres cas d'albinisme avec une coloration grisâtre de l'iris sans « le profil d'ombre » ont été rapportés (Weber et al. 1964). L'albinisme décrit chez la race Brune des Alpes correspond à une absence totale de pigment dans la peau, les muqueuses, le poil et les yeux. Les veaux albinos de cette race 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 analyses génétiques ont révélé que le phénotype « albinos » de ces animaux était autosomal récessif (Weber et al. 1964).

### 4. Gène *DUN*

La mutation du gène *DUN* agit de la même manière que la mutation Chinchilla *c<sup>ch</sup>* connue chez certaines espèces mammifère comme le chien (Berge 1961). Le gène *DUN* est responsable entre autres des couleurs de pelage des races Brown Swiss, Brahman et Chianina (Figure 15). Chez ces races, les couleurs de pelage consistent en un éclaircissement de la pigmentation de base qui tend à être complètement supprimé sur le flanc de l'animal. De plus, les mutants *Dun* sont en général dépourvus de pigments rouges et leurs extrémités sont noires.

A)



B)



Figure 16 : Exemples de bovins portants différents allèles définis pour le gène *S* (Spotting).  
A) Taureau de race Hereford (Brunes des Alpes), B) Vaches de race Pinzgauer.

L'allèle mutant hypothétique *dn* du gène *DUN* présente un caractère récessif incomplet par rapport à l'allèle normal *Dn*<sup>+</sup>. Il aurait donc un effet sur la coloration rouge, mais ne modifierait pas la coloration noire/brune (Berge 1961).

## 5. Gène *SILVER/PMEL17*

Les mutations liées à ce gène sont détaillées plus loin dans la partie III.7.g de l'exposé bibliographique.

## 6. Phénotype *white-spotting*

Le phénotype *white-spotting* ou piebaldisme correspond à des zones blanches dépourvues de pigments ; de taille et de forme variables, associées à la présence de zones pigmentées (Jackson 1994). Ce phénotype est caractéristique des races bovines Prim'Holstein, Montbéliarde, Hereford, Normandes et bien d'autres races de phénotype pie. Le terme générique *White-spotting* recouvre un certain nombre de génotypes comme le cas de la coprésence de plusieurs allèles du gène *spotting* (*S*) et/ou la combinaison de plusieurs allèles mutants (Olson 1980). Les mutations responsables du phénotype *white-spotting* sont décrites ci-dessous.

### a. Mutants du locus *S*

Trois mutations du gène *Spotting* (*S*) sont proposées en plus de l'allèle sauvage *S*<sup>+</sup> (Table 1) : L'allèle *S*<sup>H</sup> est responsable à l'état homozygote du patron de coloration du bovin de race Hereford entièrement coloré sauf au niveau de la face, de la queue et des pattes (Figure 16). L'allèle *S*<sup>P</sup> est responsable du patron de la race Pinzgauer ou lineback (ligne blanche sur le dos) (Figure 16). Ces bovins sont colorés sur les flancs mais pas au niveau de la colonne vertébrale ni sur le ventre. Et enfin, l'allèle récessif *s*, présent par exemple chez la race Prim'Holstein (Figure 13), est responsable d'un phénotype pie très irrégulier et en proportion variable. L'ordre de dominance est le suivant :  $S^H = S^P > S^+ > s$ . Ainsi, les animaux *S*<sup>H</sup>/*S*<sup>P</sup> issus de croisements des races Hereford x Pinzgauer, expriment à la fois une face blanche due à l'allèle *S*<sup>H</sup> et une bande dorsale et un flanc blanc dus à l'allèle *S*<sup>P</sup>.

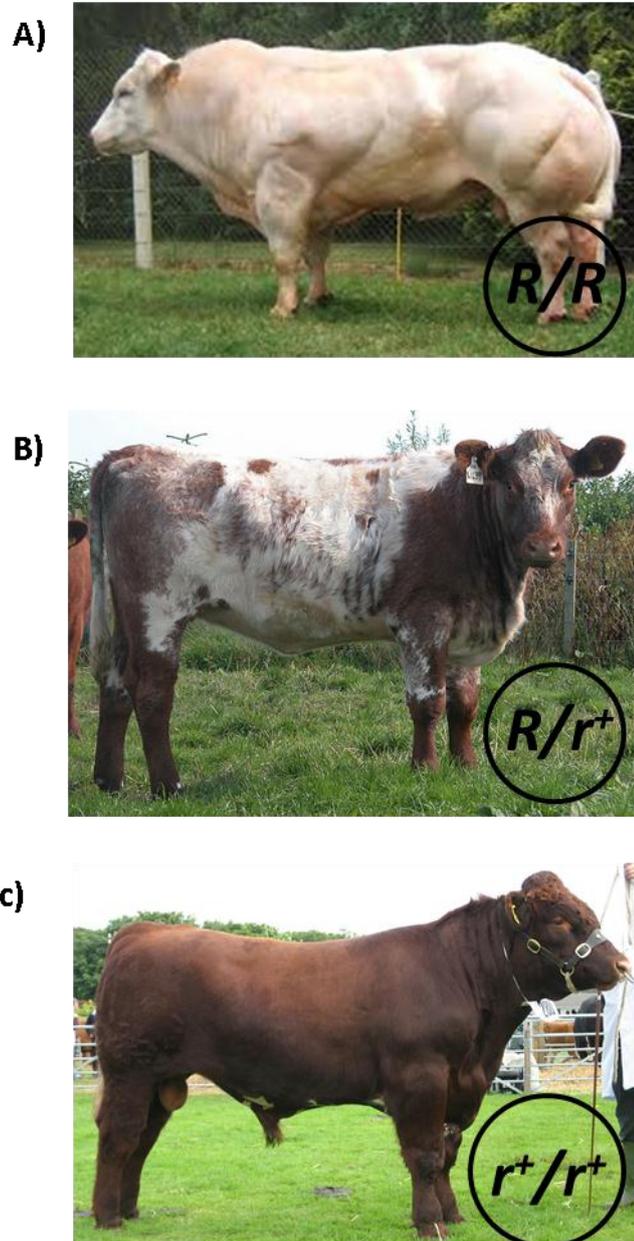


Figure 17 : Exemples de bovins porteurs de l'allèle *Roan* à l'état homozygote et hétérozygote. A) Taureau de race Blanc Bleu Belge de génotype  $R/R$ , B) Vache de race Shorthorn de génotype  $R/r^+$ , C) Taureau de race Shorthorn de génotype  $r^+/r^+$ .

Une étude sur les proportions de blanc et de noir réalisée chez la race Prim'Holstein a démontré une variabilité considérable de l'étendu des tâches blanches allant de 5 à 95% de la surface de la robe (Becerril et al. 1994). Ces variations s'expliquent par la présence de facteurs quantitatifs modificateurs du degré de *white-spotting* et hautements héritables ( $\approx 90\%$ ). Le gène impliqué dans le phénotype pie de la Prim'Holstein a été localisé sur le chromosome 6 du bovin. Le gène candidat est *KIT* (Grosz and MacNeil 1999) qui code pour le récepteur impliqué dans le développement des mélanocytes en présence de son ligand Steel.

### **b. Mutants *Blaze* (Blason)**

Le gène *BLAZE* semble avoir un rôle dans un autre profil *white-spotting* correspondant aux tâches blanches observées sur la face des animaux de race Simmental et Prim'Holstein (Olson 1999) (Table 1).

### **c. 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 des animaux hétérozygote ( $R/r^+$ ) pour le gène *ROAN*. Les homozygotes sauvages ( $R/R$ ) sont blancs à l'exception des poils sur les oreilles, alors que les mutants homozygotes ( $r^+/r^+$ ) sont colorés et ne présentent pas le mélange de poils des deux types (Figure 17). Ainsi le phénotype *Roan* est le résultat de l'effet de codominance entre l'allèle ( $R$ ) exprimant le blanc et l'allèle ( $r^+$ ) exprimant la couleur. Une proportion des femelles homozygotes blanches ( $R/R$ ) présente les symptômes de la maladie *White Heife* (responsable de malformations génitales). La mutation responsable de cette maladie se trouve dans le gène Mast Cell Growth Factor (*MCF*) ou *Steel Factor* (Seitz et al. 1999) localisé sur le chromosome 5 du bovin (Charlier et al. 1996). Le ligand Steel du récepteur c-Kit impliqué dans la migration et/ou la prolifération des mélanoblastes serait complètement déficient chez les individus  $R/R$ , ce qui entrainerait l'absence de migration de ces cellules vers le follicule pileux (Charlier et al. 1996).



**Figure 18 : Taureau de race Texas Longhorn, porteur de l'allèle *Cs* (*Colour-sided*).**



**Figure 19 : Taureau de race Belted Galloway, porteur de l'allèle *Bt* (*Belted*).**

Chez les animaux hétérozygotes cette migration est partielle, ainsi une proportion de follicules pileux ne serait pas colonisée par des mélanoblastes. Ceci implique que le nombre de mélanoblastes qui colonise un follicule pileux soit faible chez le bovin en général, ou chez les individus hétérozygotes, plus spécifiquement. La colonisation d'un follicule par un seul mélanoblaste serait alors suffisante pour générer le nombre de mélanocytes nécessaire à la formation d'un poil entièrement pigmenté, et expliquerait pourquoi les hétérozygotes ont un mélange de poils complètement pigmentés ou bien totalement blancs (Charlier et al. 1996).

#### **d. Mutants *colour-sided* (Flanc coloré)**

Le profil de coloration lié aux mutations *colour-sided* (*Cs*) est caractéristique, entre autres, de la race Texas Longhorn (Figure 18) et correspond à la présence de coloration uniquement au niveau des flancs de l'animal. Les animaux hétérozygotes présentent une bande blanche irrégulière sur les parties dorsales et ventrales ainsi que des tâches blanches sur la tête. Ces individus ont un « spotting » avec des bordures irrégulières de type *Roan*, différentes de ceux des individus  $S^P$ , qui ont des bordures bien délimitées (Olson 1999) (Table1). Les animaux homozygotes pour *Cs* expriment en général le profil « White Park » qui correspond à une robe blanche avec la présence de pigmentation au niveau des oreilles, du museau et de la partie inférieure des pattes (Olson 1999).

#### **e. Mutants *Belted***

Le profil de coloration lié au phénotype *Bt* est typique des races *Dutch Belted* et *Belted Galloway* (Figure 19, Tableau 1) et correspond à une ceinture blanche sur un fond coloré localisée sur la partie médiane du corps. Comme c'est le cas pour l'ensemble des patrons white-spotting, des facteurs modificateurs sont responsables de la largeur et de l'uniformité de cette ceinture. La mutation responsable de ce phénotype n'a pas été identifiée chez le bovin. Cependant le même phénotype *belted* existe chez le porc et la mutation responsable de ce phénotype serait localisée dans les parties régulatrices du gène *c-Kit* (Giuffra et al. 1999).

**f. Mutants *Brockling***

La présence de la mutation *Bc* en combinaison avec les autres mutations white-spotting produit de la pigmentation dans les zones qui auraient été blanches en l'absence de *Bc* (Olson 1975). Pour exemple, un croisement entre Hereford et Angus où les descendants héritent de l'allèle *Bc* d'Angus présentent des tâches pigmentées sur la face alors que celle-ci devrait être entièrement blanche en raison de la présence de l'allèle *S<sup>H</sup>*. Les races portant l'allèle *Bc* sont : Ayshire, Jersey, rouge Norvégienne et Normande. Un des avantages de ce gène pour les animaux de phénotype pie comme la Hereford, est la présence d'un profil de pigmentation autour des yeux pouvant limiter les risques de cancers oculaires (Anderson 1991).

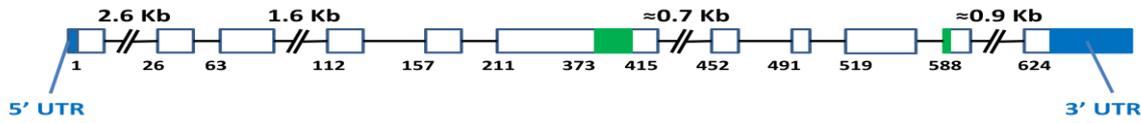
### III. *SILVER/PMEL17*

#### 1. Rôle

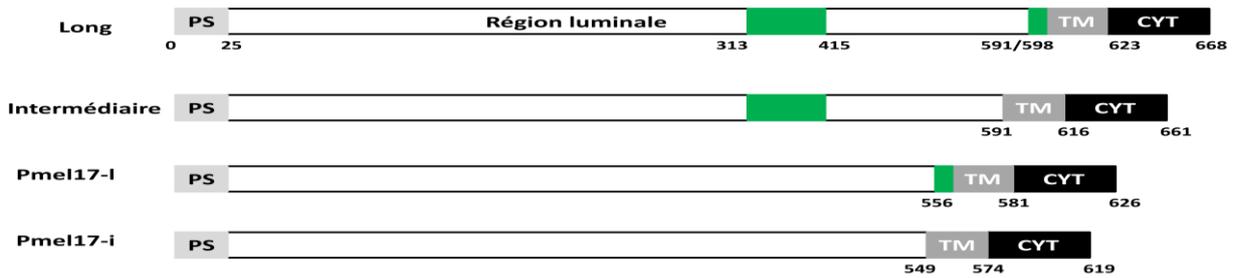
La protéine Silver/Pmel17 est un composant structural du mélanosome. Elle est responsable non seulement de la formation de la structure fibrillaire du mélanosome de stade II, mais en est également le seul constituant (Berson et al. 2001; Kushimoto et al. 2001). En effet, l'expression de celle-ci dans des cellules Hela (cellules non pigmentaires, dérivées du cancer du col de l'utérus) suffit à la genèse au sein des endosomes tardifs, de structures fibreuses similaires à celles observées dans le mélanosome de stade II (Berson et al. 2001). Ces fibrilles intraluminales servent de matrice sur laquelle les intermédiaires toxiques de la synthèse de mélanine sont concentrés, stabilisés et probablement neutralisés (Seiji et al. 1963; Spanakis et al. 1992; Raposo and Marks 2002). L'emprisonnement de ces intermédiaires à l'intérieur de la matrice fibrillaire pourrait faciliter d'une part, le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes de l'épiderme (Boissy 2003), et d'autre part, le tri entre mélanosomes et phagolysosomes dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Schraermeyer et al. 1999). Pmel17 joue également un rôle dans la synthèse de mélanine en agissant comme un catalyseur de la réaction de polymérisation de la DHICA en mélanine (Chakraborty et al. 1996; Lee et al. 1996).

L'expression de la protéine Pmel17 est spécifique aux mélanocytes de la peau, de l'uvée et ceux de l'épithélium pigmentaire de la rétine et de l'iris. Toutefois, l'expression de la protéine Pmel17 en dehors des mélanocytes de la peau et des yeux a été mise en évidence au niveau de tumeurs à cellules claires (Lantuejoul et al. 1997; Folpe et al. 2000) et d'angyomyolipomes (tumeur rénale) (Yamasaki et al. 2000; Barnard and Lajoie 2001). La présence de Pmel17 au sein de ces tissus serait probablement liée à un phénomène de dérégulation de l'expression des gènes.

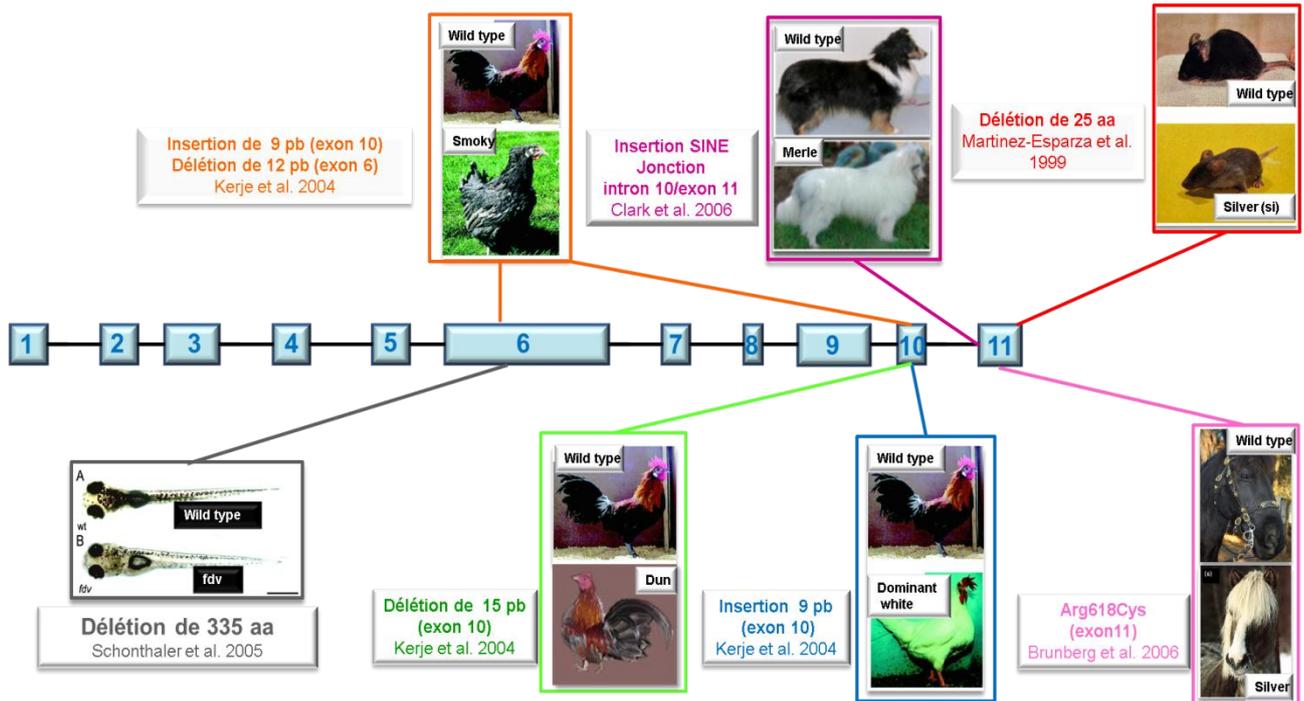
A)



B)



C)



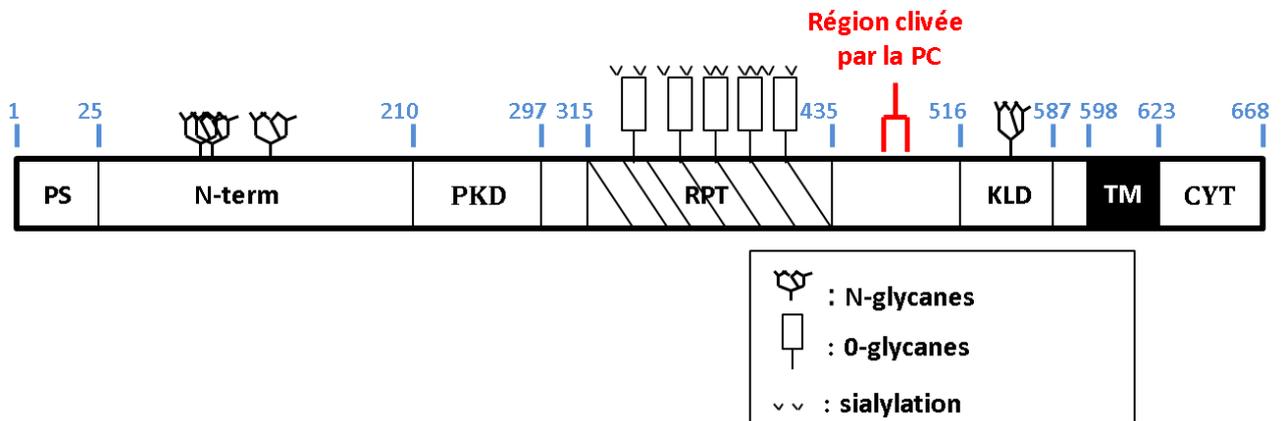
**Figure 20 : Gène *SILVER/PMEL17*, isoformes d'épissage et allèles présents chez différentes espèces. A) Organisation du gène *SILVER/PMEL17* (Bailin et al. 1996). Les exons sont indiqués par des rectangles et les introns par des lignes. Les nombres en bas indiquent les codons qui débutent chaque exon. Les régions 5' et 3' non traduites (5'UTR, 3'UTR) sont représentées en bleu. Les régions représentées en vert indiquent les exons épissés alternativement. B) Diagrammes schématiques des 4 produits issus des épissages alternatifs du pré ARNm. PS : Peptide Signal ; TM : domaine Transmembranaire ; CYT : domaine Cytoplasmique. Les nombres indiquent les acides aminés au niveau des bordures topologiques de chaque domaine (PS, Lumière TM, CYT) ou des régions alternativement épissées. C) Allèles du gène *SILVER/PMEL17* chez différentes espèces.**

## 2. Gène *SILVER/PMEL17*

Le gène humain *SILVER/PMEL17/ME20/RPE1/MMP115/gp100/gp95/gp85* est localisé sur le bras long du chromosome 12 en position 12q13-q14 (Kubota et al. 1995; Kim et al. 1996). Il est constitué de 11 exons séparés par 10 introns (Bailin et al. 1996). La structure de ce gène est conservée chez différentes espèces incluant la souris (*Mus musculus*), le bovin (*Bos taurus*), le cheval (*Equus caballus*) et le poulet (*Gallus gallus*). La partie régulatrice du gène *PMEL17* est constituée de deux éléments *cis* E-box. La première boîte E2 (CACGTG) est située à 1103 pb en amont du codon d'initiation de la transcription (Du et al. 2003). La deuxième boîte E1 (CACGTG) est située à 479 pb en aval du premier exon. Seule la boîte E1 est impliquée dans la régulation de l'expression de *PMEL17*, celle-ci est reconnue par le facteur de transcription Mitf, essentiel au développement et au maintien de la lignée mélanocytaire.

## 3. Transcrits *SILVER/PMEL17*

Les transcrits *SILVER/PMEL17* bovins sont peu connus. Chez l'homme, deux cas d'épissage alternatif du pré-ARN messager de *Pmel17* ont été décrits. Le premier cas résulte de la présence d'un site accepteur d'épissage alternatif dans l'exon 10 du gène *SILVER/PMEL17*. Il conduit à l'obtention de deux transcrits *PMEL17* différents de 21 pb, une forme longue (*PMEL17-l*) et une forme courte (*PMEL17-i*) (Adema et al. 1994; Bailin et al. 1996; Kim et al. 1996). Le transcrit *PMEL17-i* est majoritaire par rapport à *PMEL17-l*. Le deuxième cas d'épissage alternatif est présent au niveau de l'exon 6. La protéine qui en résulte est tronquée au niveau de la région répétée (RPT) du domaine luminal. La région 5'UTR du gène fait une trentaine de pb et la séquence génomique en amont contient une boîte TATA, un élément OCT-1 et un motif SP-1 (Bailin et al. 1996). La région 3'UTR comporte 124 pb et contient le signal de polyadénylation situé à 89 pb en aval du codon stop. Les 4 protéines qui résultent de l'épissage alternatif (Figure 20) comportent 619, 626, 661 et 668 acides aminés respectivement (Bailin et al. 1996; Kim et al. 1996; Nichols et al. 2003).



**Figure 21 : Diagramme schématique de la protéine Pmel17 et des différents domaines qui la composent** (Harper et al. 2008). Les nombres correspondent aux numéros des résidus délimitant chaque domaine. **PS**: peptide signal; **N-term** : *N-term domain*; **PKD** : *Polycystic Kidney Disease domain*; **RPT** : *Proline Threonine Rich-domain* ; **KLD** : *Kringle-Like Domain*; **TM** : *TransMembrane domain*; **CYT** : *Cytoplasmic domain*.

L'isoforme à 661 acides aminés est prédominant au sein des cellules mélanocytaires humaines.

#### 4. Protéine Silver/Pmel17

La protéine Silver/Pmel17 humaine fait partie de la famille des protéines membranaires de type I. Cette famille de protéine est caractérisée par la présence d'un seul domaine transmembranaire et l'orientation respective des extrémités protéiques N et C terminal vers les régions lumineales et cytoplasmiques. La protéine Pmel17 possède un peptide signal (PS) de 24 résidus en position N-terminale, une longue région lumineale (lumière du mélanosome) dont le nombre de résidus varie en fonction du produit d'épissage obtenu (578 résidus pour la forme la plus longue), un domaine transmembranaire (TM) de 24 résidus et un domaine cytosolique (CYT) de 45 résidus (Kwon et al. 1987; Adema et al. 1994; Maresh et al. 1994b; Maresh et al. 1994a) (Figure 21). Ce dernier comporte une séquence consensus di-leucine ExxPLL (ou x désigne n'importe quel acide aminé) très conservée parmi les orthologues de Pmel17. Cette séquence serait impliquée dans l'adressage de la protéine au mélanosome (Vijayasaradhi et al. 1995b). En effet, elle correspond à un signal d'internalisation ou d'endocytose, semblable au signal de ciblage des protéines Tyrp1 (Vijayasaradhi et al. 1995a) et Tyr (Honing et al. 1998; Calvo et al. 1999; Simmen et al. 1999) vers le mélanosome.

La région lumineale de Pmel17 est subdivisée en 4 sous-domaines qui sont les domaines NTR, PKD, RPT et KLD :

- **Le domaine N-terminal (NTR)** est composé de 185 résidus renfermant trois sites potentiels de glycosylation (Maresh et al. 1994a) ainsi que 3 résidus cystéine pouvant participer à la formation de ponts disulfures.

- **Le domaine PKD** (Polycystic Kidney Disease) situé en aval du NTR est un domaine composé de 87 résidus. Il a été appelé ainsi parce qu'il contient des régions répétées similaires à celles que l'on retrouve chez la protéine impliquée dans la maladie poly-kystique des reins (PKD1 : polycystic kidney disease 1) (Bycroft et al. 1999). Le domaine PKD subit un repliement semblable à celui des immunoglobulines et pourrait jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines ou protéines-lectines (Theos et al. 2005).

- **Le domaine RPT** contigu au domaine PKD est composé de 120 résidus. Il correspond pour la protéine humaine, à 10 répétitions imparfaites de 13 résidus prolines, sérines et thréonines (Kwon et al. 1991; Solano et al. 2000; Nichols et al. 2003). Des répétitions similaires sont retrouvées au sein des protéines Pmel17 de tous les vertébrés, mais la nature et le nombre de ces répétitions varient selon les espèces et les isoformes d'épissage (Nichols et al. 2003). La plupart des résidus sérines et thréonines correspond à des sites potentiels d'O-glycosylation. Le domaine RPT est indispensable à la formation de la structure fibrillaire du mélanosome de stade II dont il serait le principal constituant. En effet, la délétion de ce domaine abolit la capacité de la protéine Pmel17 humaine à former des fibrilles (Hoashi et al. 2006). De même, il a été démontré *in vitro*, que le domaine RPT était capable de former des fibrilles amyloïdes et de promouvoir la synthèse de mélanine, dans des conditions de pH proches de celles qui règnent dans la lumière du mélanosome (McGlinchey et al. 2009). Les O-oligosaccharides qui se greffent au domaine RPT sont modifiés par l'action de l'acide sialique. Ce phénomène de « sialylation » influence l'adressage de Pmel17 et détermine sa capacité à former des fibrilles (Valencia et al. 2007). Le domaine RPT est adjacent à une séquence dibasique hautement conservée correspondant au site de clivage de Pmel17 par une pro-protéine convertase (Berson et al. 2003).

- **Le domaine KLD** (Kringle-Like Domain) est constitué de 71 résidus. Il est situé en aval du domaine RPT et est caractérisé par la présence de sites potentiels de N-glycosylation et de résidus cystéines hautement conservés pouvant interagir avec des résidus lysine de certains polypeptides (Magnusson et al. 1975; Sottrup-Jensen et al. 1975). Les domaines PKD et KLD sont les plus hautement conservés dans les différents orthologues de Pmel17.

## 5. Synthèse, trafic et adressage

Comme c'est le cas pour toutes les protéines membranaires de type I, l'insertion de Pmel17 dans le RE est directement suivie par le clivage de son peptide signal. En même temps que se déroule la traduction, au moins 4 liaisons N-oligosaccharidiques sont ajoutées sur les sites consensus de Pmel17 (Maresh et al. 1994b; Berson et al. 2001). Une fraction de

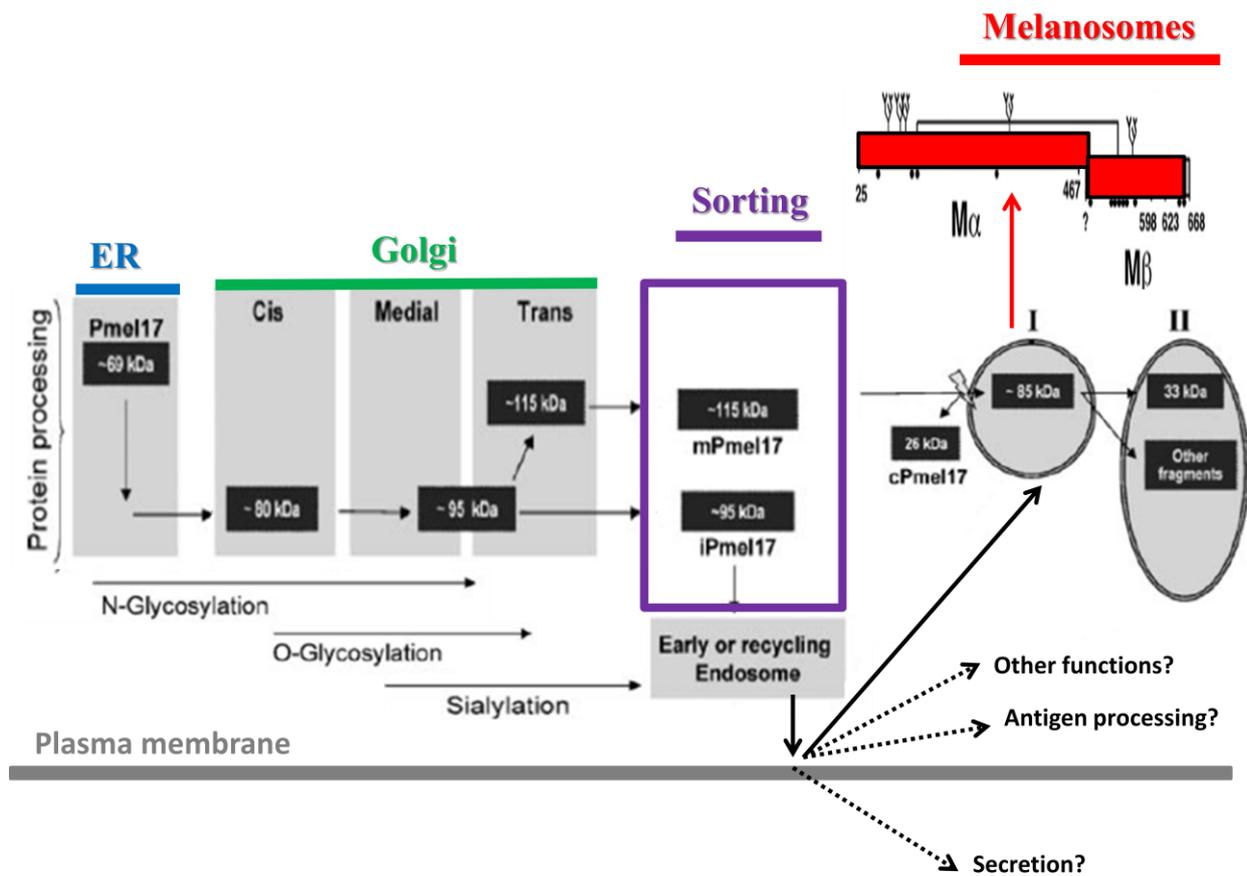


Figure 22 : Diagramme schématique de la maturation et de l'adressage de la protéine Pmel17 (Valencia et al. 2007).

Pmel17 traverse l'appareil de Golgi, où quelques liaisons N-oligosaccharides sont modifiées par les mannosidases et les glycosyl-transférases résidentes, en des formes plus complexes. De même, des liaisons O-oligosaccharides sont ajoutées, puis modifiées par l'acide sialique (Valencia et al. 2007) (Figure 21). A ce stade, Pmel17 se décline sous 2 formes qui diffèrent par leurs niveaux d'O-glycosylation : la forme immature P1/iPmel17 (95 kDa), partiellement glycosylée sensible à la digestion par l'endoglycosidase H (endo H) et la forme mature P2/mPmel17 (115 kDa), complètement glycosylée et résistante à la digestion par l'endo H (Maresh et al. 1994a; Valencia et al. 2006a). Cette résistance à l'endo H est acquise de façon concomitante aux dernières modifications apportées aux chaînes oligosaccharidiques par la N-acetylglucosaminyl transférase au sein de la partie médiane de l'appareil de Golgi (Kornfeld and Sly 1985; Van den Steen et al. 1998).

Le tri de ces protéines au niveau du trans-Golgi est contrôlé par le complexe de protéines adaptatrices (AP) qui décode la séquence signal cytoplasmique ExxPLL de Pmel17. La forme mPmel17 est transportée au prémélanosome ou mélanosome de stade primaire *via* des vésicules recouvertes de clathrines couplées à la protéine adaptatrice AP1A. La forme iPmel17 est triée vers les endosomes de recyclage pour regagner la membrane plasmique à partir de laquelle plusieurs voies d'acheminement seraient possibles : la voie de sécrétion, la voie de maturation des antigènes, l'endocytose et le transport au prémélanosome par l'intermédiaire d'AP1B et AP2 et enfin, les voies qui mèneraient vers des fonctions encore méconnues (Valencia et al. 2006b) (Figure 22).

La forme mPmel17 est clivée par une proprotéine convertase (PC) en deux sous-unités reliées par un pont disulfure, M $\alpha$  ( $\approx$ 85kDa) occupant la lumière du mélanosome et M $\beta$ /cPmel17 ( $\approx$ 26kDa) ancrée à la membrane mélanosomique. Cet ancrage se fait au niveau du domaine transmembranaire situé à l'extrémité carboxyl-terminal (Berson et al. 2003; Theos et al. 2006). Le clivage de Pmel17 interviendrait à un stade post Golgien, probablement au niveau du prémélanosome, compte tenu de la résistance à la digestion par l'endo H d'au moins deux des liaisons N-oligosaccharidiques portées par M $\alpha$  et du N-glycan porté par M $\beta$  (Berson et al. 2001). La forme iPmel17 envoyée au prémélanosome serait également clivée par la PC.

La sous-unité M $\alpha$  subit des clivages dont les positions exactes demeurent inconnues (Harper et al. 2008); cette sous-unité est ensuite triée au sein du mélanosome de stade II, où elle échafaude la matrice fibrillaire par l'intermédiaire de son domaine RPT.

## 6. Mart1/Melan-a : un partenaire mélanosomique de Silver/Pmel17

Le gène *MART1* (Melanoma Antigen Recognized by T cells 1) ou *MELAN-A* humain est localisé sur le bras court du chromosome 9 en position 9p24.1. Il code pour une petite protéine membranaire de type III de 24 kDa. Celle-ci correspond à un antigène spécifique de la lignée des cellules pigmentaires, utilisé comme marqueur spécifique du mélanosome dans le cadre d'immunothérapie contre le mélanome malin (Kawakami et al. 1995). Mart1 ne présente aucune homologie avec les autres protéines du mélanosome (Tyr, Tyrp1, Tyrp2 et Pmel17) et aucune activité enzymatique. Cependant, le profil similaire d'expression et de localisation subcellulaire de Mart1 avec les autres protéines (Kushimoto et al. 2001) ainsi que la corrélation entre cette expression et l'augmentation de la teneur en mélanine laissent supposer un rôle majeur de celle-ci dans la mélanogénèse (Hoashi et al. 2005). Malgré de nombreuses investigations, l'implication précise de Mart1 dans le processus de mélanisation n'est pas encore définie. Son interaction avec Pmel17 sous la forme de complexe a été mise en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation et de co-localisation subcellulaire. De même, des expériences d'inactivation par siRNA (small interfering RNA) et de complémentation par transfection de *MART1* ont démontré que celle-ci était indispensable à l'expression, à la stabilité et à l'adressage de Pmel17 (Hoashi et al. 2005). Par conséquent, les mélanosomes de stade II des mélanocytes n'exprimant pas la protéine Mart1 sont dépourvus de structures fibrillaires. De plus, les modèles murins délétés dans ce gène (Knock Out) présentent une dilution de la couleur du pelage qui se caractérise par une réduction de la teneur en mélanine au niveau de la peau et du poil. Cette perte de la protéine Mart1 n'a pas d'incidence sur la localisation des protéines spécifiques du mélanosome ni sur la maturation de Pmel17. Toutefois, il est à noter que les mélanosomes de stade III et IV des mélanocytes folliculaires présentent des anomalies morphologiques chez ces souris (Aydin et al. 2012). Ainsi, la protéine Mart1 serait au même titre que Pmel17, un composant structural du mélanosome, indispensable à la biogénèse de ce dernier (Hoashi et al. 2005; Aydin et al. 2012).

A)



B)



**Figure 23 : Phénotype Silver. A) Souris sauvage « *Si/Si* » C57BL6/6J, B) Souris « *si/si* » C57BL6/6J non Agouti (Silver 1995).**

## 7. Mutations de Pmel17 chez différentes espèces

### a. Souris (*Mus musculus*)

La mutation récessive *Silver* (*si*) a été décrite pour la première fois chez une lignée de souris consanguines qui présentaient une coloration du pelage grisonnante sur un fond noir avec une diminution de la pigmentation du poil qui s'accroissait avec l'âge (Dunn and Thigpen 1930). A la naissance, ces souris possèdent des poils noirs, à la suite d'une deuxième poussée de poils, elles développent le patron de coloration « *Silver gris* » (Figure 23) qui correspond à un mélange de poils à pointes blanches, de poils entièrement blancs et de poils entièrement noirs. Une variante du phénotype « *Silver gris* » est le phénotype « *Silver brun* » qui correspond à un mélange de poils entièrement bruns-marrons et des poils bruns-marrons avec des pointes blanches ou des poils entièrement blancs. Les examens macroscopiques des poils de ces souris ont montré une perte variable de pigments, correspondant à une réduction variable du nombre de granules de mélanine (Dunn and Thigpen 1930; Quevedo et al. 1981; Spanakis et al. 1992).

Le gène *SILVER* responsable de ce phénotype est localisé au niveau du locus *Silver* présent sur le chromosome 10 de la souris (Kwon et al. 1991). L'analyse moléculaire de ce gène a mis en évidence une substitution au niveau de l'exon 11. Cette mutation faux-sens est responsable de l'apparition précoce d'un codon stop entraînant la délétion des 25 derniers acides aminés en position C-terminale de la protéine Silver/Pmel17 (Martinez-Esparza et al. 1999). Ces derniers acides aminés comportent la séquence consensus di-leucine ExxPLL d'adressage de la protéine au mélanosome, reconnue par les protéines AP. Cette mutation se traduit par une perte de réactivité de la protéine avec les anticorps  $\alpha$ PEP13 dirigé contre son domaine C-terminal (Kwon et al. 1995), et HMB45 dirigé contre la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II (Zhou et al. 1994). De même, des études de fractionnement subcellulaire ont démontré que la protéine Silver/Pmel17 sauvage (WT) était détectée principalement dans les fractions mélanosomiques et prémélanosomiques tandis que la protéine mutée « *si* » était préférentiellement détectée dans les fractions solubles, traduisant ainsi l'importance du domaine C-terminal dans l'adressage de la protéine au mélanosome (Solano et al. 2000). Un défaut partiel de l'adressage de la protéine tronquée « *si* » au

mélanosome de stade II a été confirmé par des analyses western blotting ainsi que des analyses de localisation aussi bien en microscopie électronique qu'en fluorescence (Theos et al. 2006). Ce défaut partiel d'adressage de Silver/Pmel17 (*si*) se traduit d'une part, par un changement de morphologie des mélanosomes qui deviennent ronds et de très grande taille, et d'autre part, par une diminution de l'évolution de la biogenèse du mélanosome vers les stades II, III et IV (5 fois inférieures à la normale).

L'inactivation (*Knock out*) du gène *SILVER* chez des souris de différents fonds génétiques confirme le rôle primordial de Silver/Pmel17 dans la formation de la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II et dans la synthèse de pigments de mélanine (Hellstrom et al. 2011). En effet, chez les souris *Pmel17<sup>-/-</sup>*, les mélanosomes ont une forme ronde, une structure interne amorphe et présentent une réduction du contenu mélanique contrairement aux mélanosomes des souris sauvages qui pour majorité, sont ovoïdes avec une structure interne fibrillaire et chargés en mélanine (Hellstrom et al. 2011). Cependant, chez ces souris, l'inactivation de *SILVER/PMEL17* n'a qu'un effet mineur sur le phénotype de coloration du pelage. L'effet le plus prononcé est observé chez les souris *Pmel17<sup>-/-</sup>* homozygote *b/b* pour la mutation du gène *Brown*, codant pour la protéine Tyrp1. Le patron de coloration de ces souris est similaire à celui des souris portant la mutation (*si*), suggérant fortement que chez les autres espèces, les allèles de *PMEL17* avec les incidences les plus saisissantes sur la pigmentation auraient des effets dominants négatifs. Par ailleurs, ces souris sont parfaitement viables, fertiles, et ne présentent aucun défaut évident de développement.

Outre son rôle dans la formation de la matrice fibrillaire, le rôle de Silver/Pmel17 est évoqué dans la survie des mélanocytes chez les souris de génotype *si/si*. En effet, il est observé sur des coupes histologiques de peaux, une sénescence précoce des mélanocytes autour du follicule pileux et une diminution rapide de leur nombre avec l'âge (Spanakis et al. 1992). Enfin, la perte de pigments chez la souris Silver a longtemps été attribuée à une diminution du nombre des mélanocytes (Quevedo et al. 1981). Pour cause, les mélanocytes immortalisés issus de souris de génotype (*B/b si/si*) en culture, présentent une activité proliférative, 5 fois inférieure à celle des mélanocytes sauvages. Fait intéressant, le grisonnement du pelage est exacerbé chez les souris hétérozygotes de génotype (*B/b si/si*) comparé aux homozygotes de génotype (*b/b si/si*) et aux souris sauvages C57Bl/6 qui présentent un phénotype intermédiaire (Silvers 1979).

**b. Homme (*Homo sapiens*)**

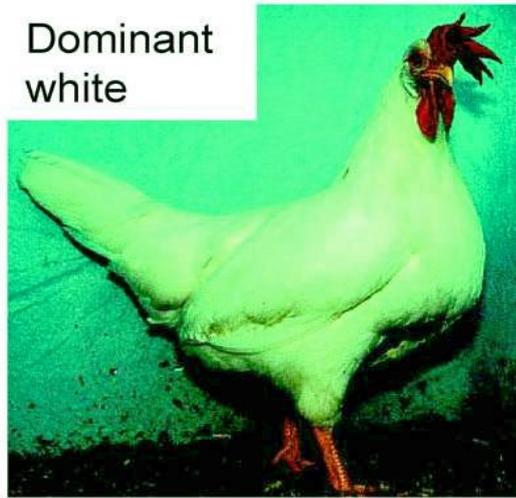
Malgré le fait que la protéine Pmel17 humaine ait été la plus étudiée, jusqu'à présent aucune mutation spontanée n'a été décrite chez l'homme. Par contre, des travaux de mutagenèse dirigée, réalisés sur la protéine Pmel17 humaine ont permis de réaliser la cartographie des domaines impliqués dans son adressage au mélanosome et dans la formation de la matrice fibrillaire (Hoashi et al. 2006; Theos et al. 2006). Il est démontré que les domaines au sein de la région M $\alpha$ , NTR, PKD et RPT (Figure 21) sont indispensables à la formation des fibrilles du mélanosome de stade II (Hoashi et al. 2006; Theos et al. 2006). Bien que l'ensemble de ces domaines puissent participer à la formation des fibrilles, les domaines NTR et PKD semblent avoir le rôle le plus crucial dans l'adressage de Pmel17 (Leonhardt et al. 2010; Leonhardt et al. 2013). L'expression transitoire du gène *PMEL17* délété de l'un de ces domaines dans des cellules Hela ou Mel220 (cellule de mélanome, négative pour l'expression endogène de Pmel17) se traduit par un défaut d'adressage de la protéine dans les compartiments riches en protéines Lamp1/Lamp2 (Lysosome), dû à l'absence de tri de celle-ci sur les membranes délimitant les vésicules intraluminales des endosomes. De même, la délétion  $\Delta 190-208$  qui correspond à une petite région à la frontière entre les domaines NTR et PKD entraîne une rétention totale de la protéine Pmel17 dans le RE. Pour d'autres délétions dans la même région, un très faible échappement du RE est observé, ces protéines mutantes parviennent au fil du temps à s'accumuler dans les compartiments riches en protéines LAMP1, à des niveaux comparables à la protéine sauvage (Leonhardt et al. 2010).

Les études de mutagenèse dirigée réalisées dans la partie C-terminale de la protéine Pmel17 humaine ont fait l'objet de controverses entre différentes équipes de recherche.

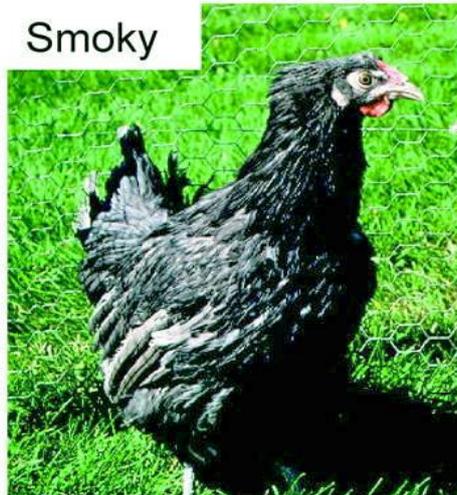
Wild type



Dominant white



Smoky



**Figure 24 : Poulets exprimant les phénotypes sauvage (wild type), Dominant white et Smoky (Kerje et al. 2004).**

Contrairement aux données de Solano *et al.*, décrites dans la partie précédente, les travaux de Hoashi (Hoashi et al. 2006) ont montré que la délétion du domaine C-terminal ( $\Delta$ CTD) n'affectait ni l'adressage, ni la maturation de la protéine Pmel17 exprimée dans des cellules Hela. Il en est de même pour la mutation LL622AA dans la partie C-terminale. Les travaux de Theos (Theos et al. 2006) recréant la mutation observée chez la souris (*si*) dans des cellules humaines sont en cohérence avec les travaux de Solano et démontrent un défaut d'adressage de la protéine mutée (*si*) au mélanosome. Celle-ci est localisée majoritairement au niveau du RE, de la membrane plasmique et faiblement dans les endosomes multivésiculaires. Ces résultats qui vont à l'encontre de ceux de Hoashi, remettent en cause l'utilisation de cellules Hela comme système d'expression pour l'étude des protéines spécifiques aux mélanocytes (Theos et al. 2006).

### c. Poulet (*Gallus gallus*)

Dominant White, Dun et Smoky sont les allèles du gène *PMEL17* chez le poulet domestique.

- **La mutation Dominant White (DWhite)** est la première mutation à être décrite chez le poulet. Elle correspond à une insertion de 9 paires de bases dans l'exon 10 conduisant à l'addition de 3 acides aminés dans la région transmembranaire de Pmel17 (Kerje et al. 2004). Cette mutation est assignée du symbole **I** en raison de son effet inhibiteur sur la pigmentation. L'allèle (**I**) a une dominance incomplète sur l'allèle sauvage (*i*). La mutation DWhite est caractéristique de la race de poulet White Leghorn à laquelle elle procure un plumage blanc uniforme (Figure 24). La coloration du bec, des pattes (qui sont jaunes) et des yeux (bruns) n'est pas affectée en raison de la spécificité de cette mutation aux mélanocytes originaires de la crête neurale (Smyth 1990).

Les premières études attribuaient le phénotype hypomélanique à « la mort des mélanocytes » (Cleland et al. 1940; Jimbow et al. 1974). Ensuite, il a été démontré par microscopie électronique que les mélanosomes des animaux hétérozygotes (**I/i**) étaient sphériques et dépourvus de structures fibrillaires organisées (Brumbaugh and Lee 1975).

L'isolation de l'ADNc DWhite à partir de cellules épithéliales pigmentées de poulets White Longhorn a conduit à la caractérisation de la protéine DWhite comme marqueur spécifique de ce type cellulaire (Mochii et al. 1991). Ensuite, des analyses immunohistochimiques utilisant l'anticorps MC1 dirigé contre la portion centrale de la protéine Pmel17 de poulets ont démontré que celle-ci était localisée au niveau des mélanosomes au sein de cellules issues de mélanomes (Mochii et al. 1988; Mochii et al. 1991).

Les mécanismes moléculaires par lesquels la mutation DWhite affecte le trafic membranaire de Pmel17, la structure du mélanosome ou encore ceux par lesquels elle conduit à la mort des mélanocytes restent à définir. Récemment, il a été démontré que le caractère dominant négatif de la mutation DWhite pouvait interférer avec la fonction de la protéine sauvage en conduisant à la formation de complexes non fonctionnels (Kuliawat and Santambrogio 2009). Ainsi, l'expression de la protéine Pmel17 DWhite en combinaison avec la protéine Pmel17 sauvage humaine dans des mélanocytes en culture primaire révèle une interaction physique entre ces deux protéines qui est corrélée à un défaut d'élaboration de la matrice fibrillaire (Kuliawat and Santambrogio 2009). Les auteurs expliquent cette perte de fonction par une altération spécifique de l'assemblage des fragments M $\alpha$  sauvages au sein du mélanosome.

- **La mutation Dun (D)** a été identifiée chez le poulet de race Pit-gamecock (Ziehl et al. 1987) et correspond à une délétion de 5 acides aminés dans le domaine transmembranaire de la protéine Pmel17 (Kerje et al. 2004). L'allèle (D) a une dominance partielle sur l'allèle sauvage (*i*). Les poulets hétérozygotes (D/*i*) sont de phénotype Dun et ont un plumage de coloration brune foncée tandis que les poulets homozygotes (D/D) ont un plumage de couleur blanchâtre. Cette mutation affectant le même domaine que (I) pourrait empêcher l'ancrage de Pmel17 à la membrane du mélanosome altérant ainsi, la biogenèse de ce dernier (Kerje et al. 2004).

- **La mutation Smoky (S)** est présente chez les poulets de race Longhorn homozygote DWhite (II). L'allèle (S) combine ainsi l'insertion des 9 paires de bases dans l'exon 10 du DWhite avec la délétion de 12 paires de bases dans l'exon 6, éliminant ainsi 4 acides aminés de la protéine mature. Cet allèle présente une dominance partielle sur l'allèle sauvage « *i* » et une récessivité par rapport au DWhite (I). Le phénotype (S) qui est assimilé à une réversion



**Figure 25 : Chiens de race Shetland Sheepdog porteurs ou non de la mutation Merle. A) Chien non Merle «  $m/m$  » tricolore (noir, sable et blanc), B) Chien simple Merle «  $M/m$  » dit de coloration bleu, C) Chien double Merle «  $M/M$  » blanc avec des patches bleus et sables (Clark et al. 2006).**

de la mutation DWhite, restaure partiellement la pigmentation et confère une coloration grisâtre au plumage (Kerje et al. 2004).

#### d. Chien (*Canis lupus familiaris*)

Le profil de coloration « Merle » correspond à des patches de pigments dilués présents sur la robe des chiens de compagnie. Ce caractère autosomique est co-dominant par rapport au caractère sauvage. Des analyses moléculaires d'ADN génomique de chiens de race Shetland sheepdog ont révélé l'insertion d'un élément « Short **IN**terspersed Element » (SINE) au niveau de la jonction entre l'intron 10 et l'exon 11 du gène *SILVER/PMEL17* (Clark et al. 2006). Cet élément SINE est absent chez les chiens non Merle (*m/m*) (Figure 25), où (*M*) représente le caractère Merle et (*m*) le caractère non Merle. L'élément SINE a une taille de 253 paires de bases et possède une queue oligo (dT), dont la taille varie en fonction de l'animal. L'insertion de l'élément SINE n'est pas un marqueur spécifique de la race Shetland sheepdog, celui-ci est présent sous forme hétérozygote chez les chiens Merle de races Collie, Border Collie, Australian Sheperd, Cardigan Welsh Corgi, Dachshund et Great Dane. Outre le phénotype Merle, la présence de l'élément SINE est associée à des troubles auditifs pouvant conduire à une surdité complète chez des chiens de race Dachshunds (Reetz et al. 1977). Des études ophtalmologiques menées sur trois groupes de chiens de race Dachshunds (double Merle *M/M*, Merle *M/m*, et non Merle *m/m*), ont démontré que les animaux Merle et double Merle présentaient fréquemment des troubles oculaires (Klinckmann et al. 1987; Klinckmann and Wegner 1987). Ces troubles se traduisent par un défaut de la réfraction de l'œil caractérisé par une mauvaise mise au point des images rétiniennes venant d'objets situés à l'infini ou par un effort de mise au point.



**Figure 26 : Description phénotypique de chevaux portant la mutation *Silver*. A) Cheval de race **Iceland** qui présente le phénotype *Silver* typique, avec un corps noir tacheté de poils blancs. Le sommet du museau, la crinière et la queue sont entièrement blancs, B) Deux chevaux noirs de race **Rocky Mountain** avec des tâches de couleur argent « *Silver* » sur tout le corps, C) Cheval de race **Morgan Brown**, le phénotype *Silver* correspond à une dilution de la coloration du poil du noir au blanc au niveau de la crinière et de la queue, et du noir au gris foncé au niveau du bas des jambes, D) Bas des jambes du cheval **Morgan Brown** (Brunberg et al. 2006).**

**e. Cheval (*Equus caballus*)**

Le phénotype « Silver » chez le cheval est caractérisé par une dilution du pigment noir du poil dans un mélange de poils blancs et gris, nettement visible au niveau de la crinière et de la queue (Figure 26). Ce phénotype présente un mode de transmission autosomique dominant et est attribué à deux mutations du gène *SILVER/PMEL17*, localisées sur le chromosome 6 en position ECA6q23 (Brunberg et al. 2006). Ces mutations ont été identifiées chez différentes races de chevaux. La première mutation est faux-sens, elle se trouve dans l'exon 11 et correspond à la substitution d'une arginine par une cystéine en position 618 (Arg618Cys), qui intervient dans le domaine cytoplasmique de Pmel17. La deuxième se trouve dans l'intron 9, à une distance de 759 paires de bases de la mutation faux-sens. Les deux mutations sont associées au phénotype « Silver ». Cependant, seule la mutation faux-sens semble être causale. Ainsi, les 14 races de chevaux de phénotype « Silver » étudiées par Brunberg *et al.*, possédaient au moins une copie de l'allèle muté (Arg618Cys). Outre le phénotype « Silver », cet allèle est responsable de multiples anomalies oculaires congénitales que l'on retrouve en particulier chez les chevaux de races Rocky Mountain et Island (Andersson et al. 2008; Andersson et al. 2011). Ces anomalies sont principalement localisées dans la partie frontale de l'œil. Elles se traduisent par le développement de kystes au niveau du corps ciliaire, de la rétine ou de l'iris chez les chevaux porteurs de la mutation à l'état hétérozygote et par le développement de cataractes congénitales et d'hypoplasies de la rétine pour ceux porteurs de la mutation à l'état homozygote.



**Figure 27 : Pigmentation du corps du mutant fading vision (fdv).** A) Type sauvage (wt) à 5 jours de développement larvaire, B) Larve mutante (fdv) avec une pigmentation du corps moins prononcée par rapport à la larve de type sauvage. La barre d'échelle correspond à 500  $\mu$ M (Schonthaler et al. 2005).

**f. Poisson zèbre (*Danio rerio*)**

La mutation *fading vision* « *fdv* » est la première mutation affectant la coloration décrite chez le poisson (Schonthaler et al. 2005). Elle consiste en la substitution d'une guanine par une thymine en position 1468 paires de bases de l'ADNc de SILV(a)/SILVER. Cette mutation génère un codon stop précoce au niveau du résidu aminoacide en position 490. La protéine mutante est déléetée de 335 résidus aminoacides qui englobent la totalité du domaine transmembranaire ainsi que deux motifs essentiels à sa fonction et à sa localisation : le site de clivage par la proprotéine convertase et le motif de fixation des protéines AP (Le Borgne et al. 2001). Cette mutation affecte la biogenèse des mélanosomes au niveau de la peau et de l'épithélium pigmenté rétinien (RPE). Ces mélanosomes ont une morphologie aberrante et un contenu mélanique réparti de façon anarchique, privilégiant l'hypothèse d'un déficit dans la structure intra-mélanosomale à celle d'un déficit dans la synthèse de mélanine. Il en résulte le phénotype « *fdv* » qui correspond à une hypopigmentation des mélanocytes du RPE et de la peau (Figure 27), et une perte de la fonction visuelle dès le 5<sup>ème</sup> jour du développement larvaire, partiellement réversible à l'âge adulte.

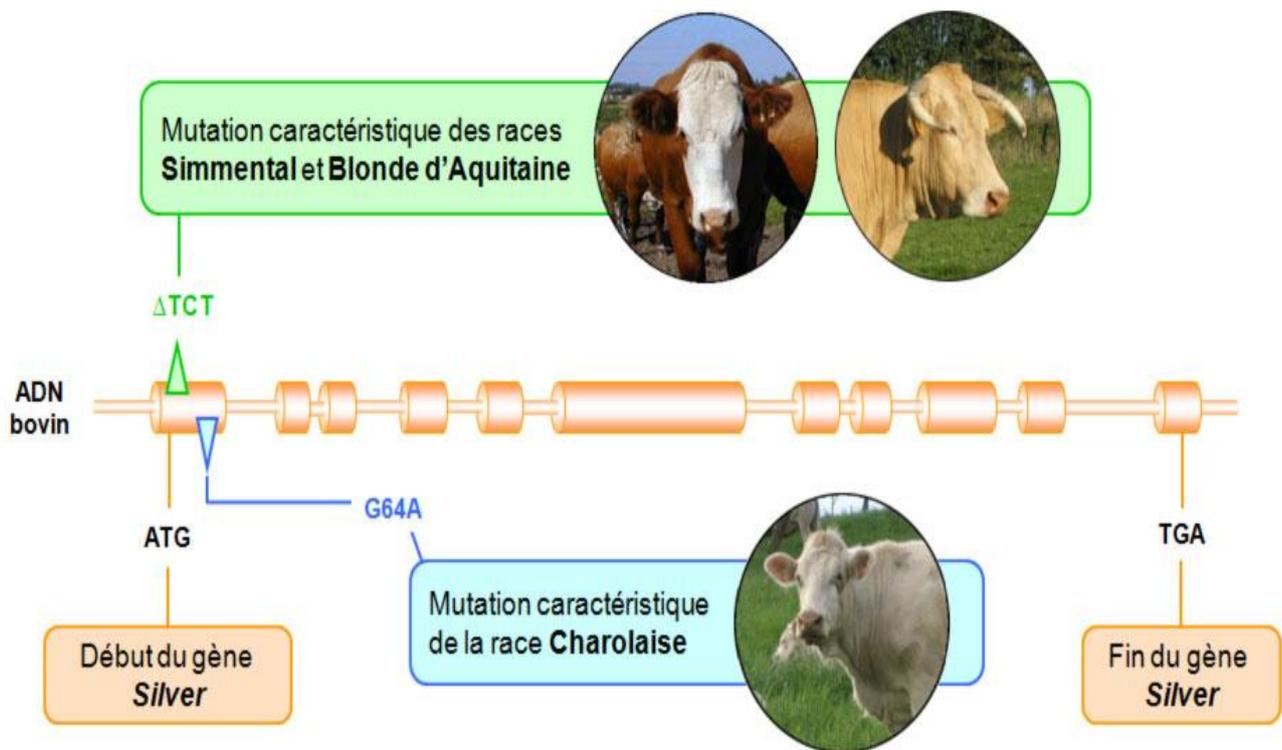


Figure 28 : Mutations du gène *SILVER/PMEL17* bovin, spécifiques des races Simmental, Blonde d'Aquitaine et Charolaise.

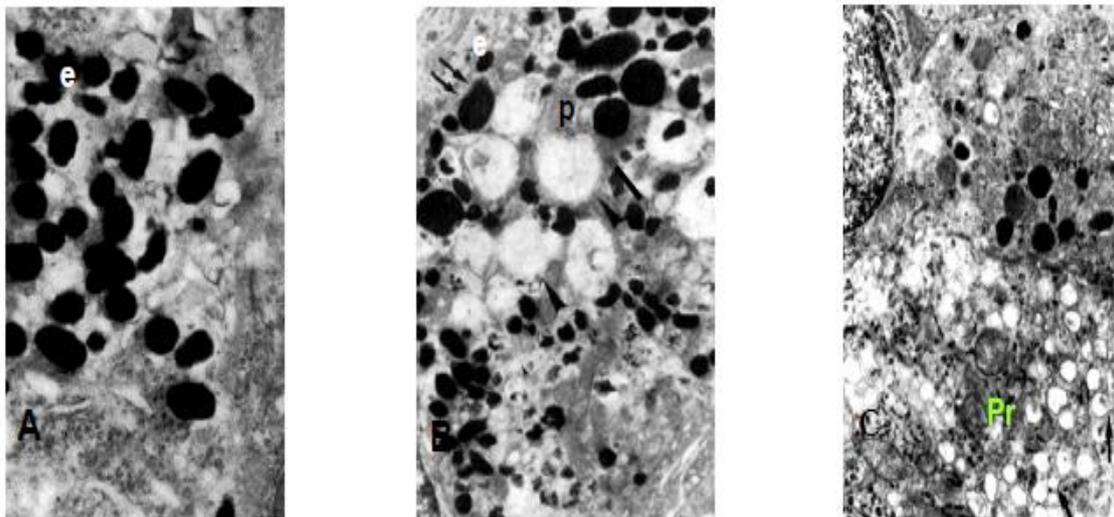
### g. Bovin (*Bos taurus*)

Le gène *SILVER/PMEL17* bovin est localisé sur le chromosome 5 (BTA5). Son organisation est identique aux gènes *SILVER/PMEL17* décrits chez les autres espèces. Il est constitué de 11 exons séparés par 10 introns. Le transcrit Silver/Pmel17 comprend 1950 nucléotides, avec des extrémités 5'UTR et 3'UTR de 29 et 106 nucléotides respectivement. Il code pour une protéine composée de 649 résidus aminoacides (Oulmouden et al. 2005). Les travaux réalisés par Oulmouden *et al.*, ont identifié deux mutations du gène *SILVER*. L'une de ces mutations correspond à une substitution d'une Guanine par une Adénine en position 64 (G64A). Cet allèle est présent exclusivement chez la race Charolaise (Figure 28), et est désigné par *si* (*silver*). L'autre mutation correspond à la délétion du trinuécléotide Thymine-Cytosine-Thymine en position 53 ( $\Delta$ TCT53). Cette mutation est identifiée chez les races Simmental et Blonde d'Aquitaine, et l'allèle est désigné par *siI*. Les allèles (*si*) et (*siI*) sont également connus sous les dénominations respectives de *Dc* (Dilution Charolaise) et *Ds* (Dilution simmental) en référence à leurs associations avec les loci de dilution anciennement décrits chez les races Charolaise et Simmental (Renieri et al. 1993). Les deux mutations affectent le peptide signal de la protéine. (*si*) résulte d'une substitution d'un résidu Glycine par un résidu Arginine Gly22Arg en position -3 du site de clivage du peptide signal. (*siI*) résulte d'une délétion du 19<sup>ème</sup> résidu Leucine  $\Delta$ L19 en position -6 du site de clivage du peptide signal. Les études *in silico* (<http://expasy.org/>) montrent une altération de l'hydrophobicité du peptide signal et de sa longueur pour (*si*) et (*siI*) respectivement. Ces altérations laissent supposer une inhibition du clivage du peptide signal qui conduirait au blocage de la protéine dans le RE.

La race Charolaise présente le cas le plus extrême de dilution. Les individus Charolais de race pure, malgré le génotype Extension (*e/e*) qui confère en principe une coloration rouge, ont une robe blanche uniforme. Par conséquent, la robe blanche caractéristique de cette race serait le résultat de la dilution de la phéomélanine sur tout le corps. Par des analyses réalisées chez des individus F2 issus de croisements entre animaux Charolais x German Holstein, Kuhn et al., ont démontré une association entre l'allèle (*si*) et la dilution des eumélanosomes. Ces auteurs n'ont pas écarté l'hypothèse d'une association entre l'allèle (*si*) et la dilution des phéomélanosomes, malgré le fait qu'ils n'aient pas inclus des animaux de fond génétique rouge dans leurs analyses. Cependant, ils ont évoqué l'effet d'un autre facteur génétique

modulant la dilution causée par l'allèle (*si*) pour expliquer la diversité phénotypique allant du gris (blanc crémeux au gris clair) au jaune/rouge, observée chez les individus F2 issus de ce croisement (Kuhn and Weikard 2007). Gutierrez-gil *et al.*, ont démontré par «Genome scan.» (balayage du génome), que le locus génétique responsable du phénotype de dilution se trouvait dans la région [ETH10-DIK5248] du chromosome 5. Ils ont choisi *SILVER/PMEL17* comme gène candidat et ont validé l'association de l'allèle (*si*) avec une dilution de la coloration eumélanique et ont également montré une association significative de ce dernier avec une dilution de la coloration phéomélanique (Gutierrez-Gil et al. 2007). Ainsi, les individus homozygotes de génotype (*si/si*) sont blancs, et les individus hétérozygotes de génotype (*si/si<sup>+</sup>*) où *si<sup>+</sup>* est l'allèle sauvage ont un phénotype intermédiaire : gris si la dilution s'applique à l'eumélanine ou rouge pâle voire jaune si la pigmentation de fond est phéomélanique. Le mode de transmission proposé est une co-dominance. Cependant ils ont eu quelques animaux de phénotype blanc incohérents avec les génotypes (*si/si<sup>+</sup>*) et gris et rouge pâle de génotype (*si/si*). Ils ont suggéré l'implication du gène *LYST* (Lysosomal Trafficking regulator) pour expliquer ces incohérences. La variation allélique du gène *LYST* aurait un effet modulateur sur la dilution causée par l'allèle (*si*), ce qui expliquerait les différentes nuances de couleurs observées dans le cas de dilution partielle. Chez la race japonaise de phénotype noir, des mutations de ce gène sont responsables d'une coloration claire de la robe (Ogawa et al. 1997). Chez l'homme et la souris, elles sont également responsables du syndrome de Chediak-Higashi de type I, maladie transmise selon un mode autosomique récessif qui affecte la synthèse et la maintenance des granules de sécrétions (lysosomes, mélanosomes, etc). Ces granules sont de taille plus importante, formant des méga-granules ou corps de Chediak qui permettent de confirmer le diagnostic de cette maladie. Cette maladie associe un albinisme oculo-cutané partiel (cheveux blond/blanc/argent, peau et yeux claire) et un défaut d'activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules Natural Killer (NK).

La mutation (*si1*) décrite chez le bovin de race Highland est associée à la fois à la dilution de l'eumélanine et de la phéomélanine (Berryere et al. 2007). Les bovins portant l'allèle  $E^D$ , hétérozygotes pour la mutation (*si1*) sont « *dun* » tandis que les homozygotes sont « *dun* » et gris. Les bovins de génotype ( $E^+/e$ ), homozygotes pour la mutation (*si1*) sont blancs crème tandis que les hétérozygotes sont jaunes (blond).



**Figure 29 : 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).

## IV. PROJET D'ETUDE

Dans le cadre des travaux de recherche de marqueurs génétiques utilisables comme outil d'authentification de l'origine raciale des bovins, notre équipe a mis en évidence un marqueur génétique de la race Charolaise : l'allèle (*si*) du gène *SILVER/PMEL17* (Oulmouden et al. 2005). Ce marqueur génétique unique en son genre, confère une robe de coloration blanche crémeuse aux animaux Charolais et caractérise tous les animaux de cette race à l'exclusion de tous les animaux des autres races bovines.

L'allèle (*si*) du gène *SILVER/PMEL17* consiste en une mutation qui affecte le peptide signal de la protéine Pmel17. Il s'agit d'une substitution d'un résidu Glycine par un résidu Arginine qui intervient en position -3 par rapport au site de clivage du peptide signal. La proximité de cette mutation par rapport au site de clivage ainsi que le changement d'hydrophobicité qu'elle engendre sont des conditions d'une inhibition du clivage du peptide signal par l'endopeptidase (Allison and Young 1989). De ce fait, l'hypothèse émise concernant la perte de fonction de la protéine Pmel17 est celle d'un rôle inhibiteur de la mutation Charolaise sur le clivage du peptide signal avec pour conséquence, le blocage de la protéine Pmel17 au niveau du RE. Ainsi, l'élaboration fonctionnelle de la matrice du mélanosome n'aurait pas lieu et ce dernier resterait bloqué à son premier stade de la biogenèse (stade pré-mélanosome) sous forme de vésicules non fonctionnelles. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Renieri *et al* (Figure 29) qui montrent une absence de mélanosomes matures au sein de coupes de peaux Charolaise observées en microscopie électronique (Renieri et al. 1993).

Le travail que j'ai mené a eu pour objectif de démontrer que l'absence d'élaboration fonctionnelle de la matrice du mélanosome responsable du phénotype blanc crémeux de la robe du bovin Charolais est associée à la mutation dans la région codant le peptide signal du gène *SILVER/PMEL17*. Ce travail qui a consisté en l'apport de preuves fonctionnelles relatives à l'allèle charolais du gène *SILVER/PMEL17* revêt deux intérêts majeurs. D'une part, la mutation Charolaise est le seul cas de mutation répertoriée dans la séquence signal au sein d'un des gènes de la coloration, conduisant à une perte totale de fonction de la protéine ; d'autre part, cette mutation pose l'hypothèse d'une implication de la protéine Silver/Pmel17 dans la phéomélanogenèse chez le bovin, à l'inverse des études menées chez d'autres espèces qui indiquent une implication de celle-ci uniquement dans l'eumélanogenèse (Martinez-Esparza et al. 1999; Kerje et al. 2004; Brunberg et al. 2006; Clark et al. 2006).

# *MATERIEL ET METHODES*

# I. MATERIEL BIOLOGIQUE

## 1. Souche bactérienne

Le clonage et l'amplification des ADN plasmidiques ont été effectués dans la souche *Escherichia coli*, DH5 $\alpha$  chimio-compétente (Top10, Invitrogen). Son génotype est : F- mcrA,  $\Delta$  (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74 recA1, araD139  $\Delta$  (ara-leu) 7679, galU, galK, rpsL (Str<sup>r</sup>), endA1, nupG (Hanahan 1983).

## 2. Souche de levure

La souche Y10000 (BY4742, EUROSCARF) de génotype MAT $\alpha$  trp1  $\Delta$ his3  $\Delta$ ura3  $\Delta$ leu2 met15 employée dans ces travaux appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Cet ascomycète hétérothallique présente un cycle de reproduction haplodiplophasique, qui permet une analyse génétique classique.

## 3. Echantillons de peaux bovines

Les échantillons de peaux bovines de races Charolaise, Prim'Holstein, Limousine, Salers et Parthenaise ont été récupérés auprès des abattoirs Sobeval de Périgueux et Socopa viandes de Villefranche d'Allier. Les prélèvements de peaux (généralement 5 cm) sont effectués le plus tôt possible (quelques minutes) après l'abattage. Les échantillons de peaux sont nettoyés à l'éthanol, rincés à l'eau puis rasés avant de retirer le tissu adipeux sous-cutané. Ils sont ensuite congelés dans une solution d'isopentane refroidit à l'azote liquide puis conservés à -80°C.

#### 4. Lignées cellulaires

Trois lignées cellulaires adhérentes ont été utilisées au cours de cette étude : les lignées COS7, Melan-a et CHO-K1. Les cellules COS7 ont été initialement isolées à partir de fibroblastes rénaux de singe vert africain. C'est une lignée appropriée pour la transfection par des vecteurs exprimant l'antigène SV40 T (Gluzman 1981). Les cellules Melan-a sont des mélanocytes fortement pigmentés, isolés à partir d'épidermes de souris de souche C57BL/6J. Cette lignée cellulaire est couramment utilisée pour l'étude de protéines impliquées dans le processus de pigmentation (Bennett et al. 1987). Les cellules CHO-K1 proviennent d'un sous clone de la lignée parentale CHO, isolées à partir d'ovaires de hamsters Chinois adultes. Les cellules CHO-K1 diffèrent des cellules CHO parentales par leurs quantités d'ADN légèrement plus faibles.

#### 5. Plasmides

Trois types de plasmides ont été utilisés : les plasmides TOPO XL PCR cloning vector, PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen), et le plasmide pRS326-Gal1-MCS-GFP gracieusement fournis par le Dr Thierry FERREIRA (IPBC, Université de Poitiers).

##### a. TOPO XL PCR cloning vector

TOPO XL PCR cloning vector est un vecteur linéaire qui permet le clonage rapide (5 min) et en une seule étape de produits PCR de taille comprise entre 3 et 10 Kb dans des bactéries. Ce vecteur possède un résidu désoxythymidine (T) qui surplombe son extrémité 3' qui va se lier au résidu déoxyadénosine (A), généralement rajouté par les Taq polymérase aux extrémités 3' des produits PCR. La liaison covalente entre A et T résulte d'un mécanisme de conservation d'énergie lié à l'activité de la topoisomérase I (Figure 30). Ce vecteur dispose d'un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection de transformants *E.coli*.

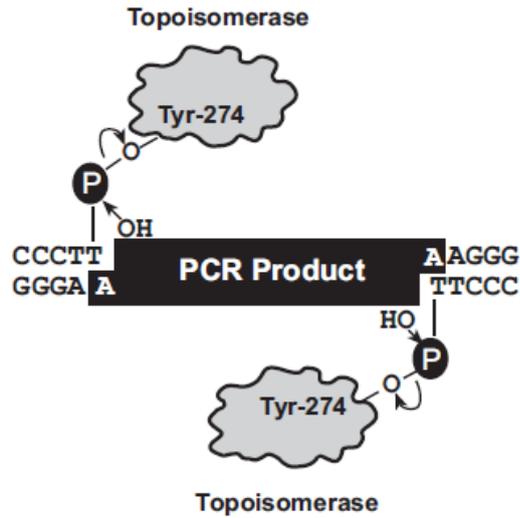


Figure 30 : Réaction d'insertion du produit PCR au sein des plasmides TOPO XL PCR cloning vector et PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA.

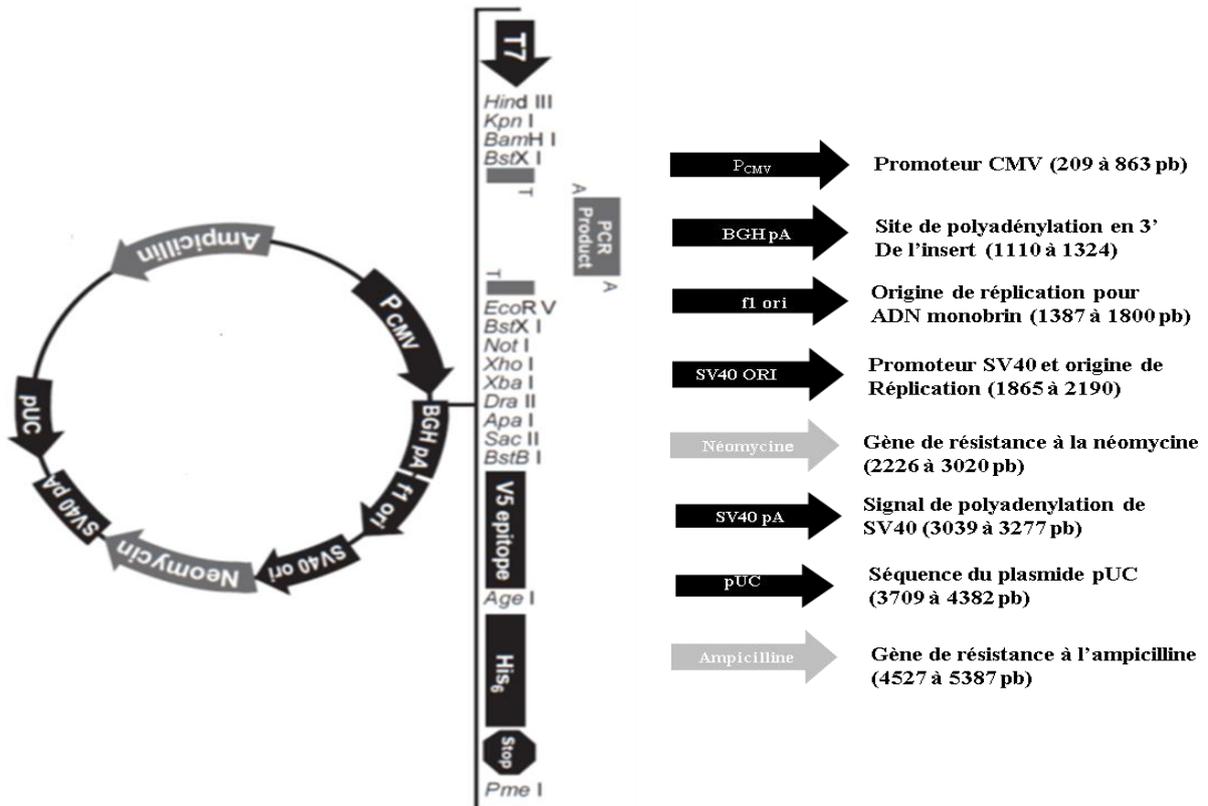


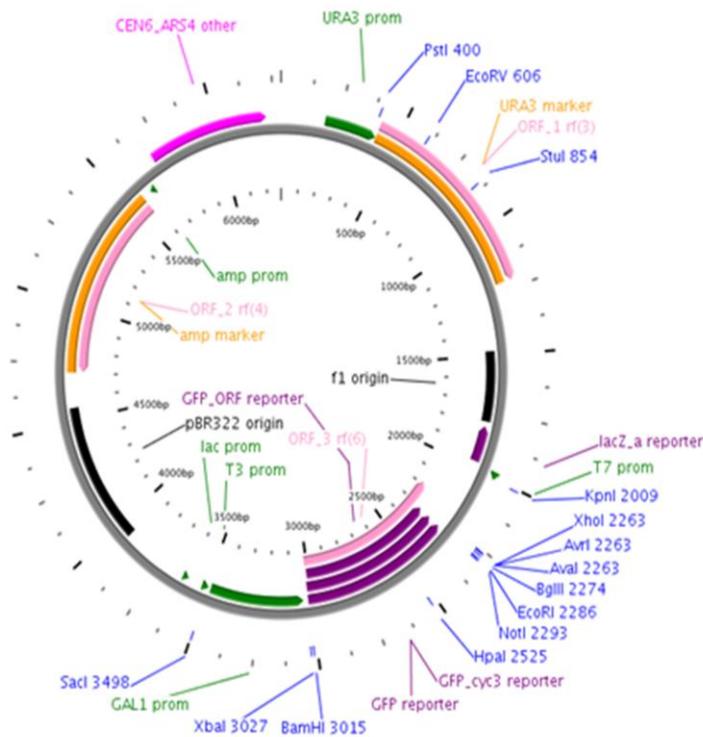
Figure 31: Cartographie des différents sites du plasmide PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA

**b. PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA**

PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA est un vecteur linéaire qui permet le clonage rapide (5 min) et en une seule étape par insertion directe de produits PCR dans le vecteur (Figure 31). Le principe de l'insertion du produit PCR dans le vecteur est le même que celui du TOPO XL, à la différence que PCDNA 3.1 est destiné à l'expression de protéines dans les cellules de mammifères. Ce vecteur permet une fusion traductionnelle de la protéine d'intérêt avec l'épitope V5 et une étiquette polyhistidine (6XHis). Il dispose du gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection de transformants bactériens et le gène de résistance à la néomycine pour la sélection de transformants eucaryotes.

**c. pRS326-Gal1-MCS-GFP**

pRS326-Gal1-MCS-GFP est un plasmide multicopies possédant un site de clonage multiple situé en aval du promoteur Gal1, ce dernier est inductible par le galactose. pRS326-Gal1-MCS-GFP possède également, d'une part le gène URA3 qui code pour une enzyme impliquée dans la synthèse d'Uracile et qui sert de marqueur de sélection des levures et d'autre part, le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection de transformants *E.coli* (Figure 32). Ce plasmide permet une fusion traductionnelle de la protéine d'intérêt avec la « Green Fluorescent Protein » (GFP) en position C-terminale. pRS326-Gal1-MCS-GFP dérive du plasmide pUC 19 (Dupre et Haguenaer-Tsapis, 2001a). Une autre version du vecteur pRS326 a été établie en remplaçant la séquence correspondant à la GFP par celle de la polyhistidine (6XHis) (pRS326-Gal1-MCS-6XHis).



- Promoteurs
- Origines de répliation
- Cadre de lecture ouvert
- Marqueurs de sélection
- Sites uniques de restriction
- Gènes rapporteurs
- Autres gènes

Figure 32 : Cartographie des différents sites du plasmide pRS326-Gal1-MCS-GFP

## 6. Anticorps

Les anticorps utilisés au cours de cette étude sont énumérés dans les tableaux 2 à 5. Ils peuvent être subdivisés en 4 grands groupes : les anticorps spécifiques de Pmel17, les anticorps spécifiques des enzymes de la famille des tyrosinases, les marqueurs compartimentaux et les anticorps dirigés contre les protéines de fusion.

<b>Anticorps</b>	<b>Protéines</b>	<b>Epitopes</b>	<b>Espèces</b>	<b>Formes</b>	<b>Fournisseurs</b>
<b><math>\alpha</math>PEP13</b>	Pmel17	C-terminal	Souris	P1, P2, M $\beta$	Gracieusement fourni par le Pr V Hearing (National cancer institut, Bethesda)
<b><math>\alpha</math>PEP13h</b>	Pmel17	C-terminal	Humain	P1, P2, M $\beta$	Gracieusement fourni par le Pr V Hearing(National cancer institut, Bethesda)
<b>Anti GP100</b>	Pmel17	C-terminal	Souris	P1, M $\beta$	Abcam
<b>HMB45</b>	Pmel17	C-terminal	Souris	M $\alpha$ , RPT	ThermoFisher Scientific

**Tableau 2 : Anticorps spécifiques de Pmel17**

<b>Anticorps</b>	<b>Protéines</b>	<b>Epitopes</b>	<b>Espèces</b>	<b>Fournisseurs</b>
<b><math>\alpha</math>PEP1</b>	TYRP1/gp75/TRP1	C-terminal	Souris	Gracieusement fourni par le Pr V Hearing (National cancer institut, Bethesda)
<b><math>\alpha</math>PEP7</b>	TYR	C-terminal	Souris	Gracieusement fourni par le Pr V Hearing (National cancer institut, Bethesda)
<b><math>\alpha</math>PEP8h</b>	DCT/TRP2	C-terminal	Humain	Gracieusement fourni par le Pr V Hearing (National cancer institut, Bethesda)
<b>Anti TYRP1</b>	TYRP1	C-terminal	Lapin	Sigma Aldrich

**Tableau 3 : Anticorps spécifiques des enzymes de la famille des tyrosinases**

<b>Anticorps</b>	<b>Protéines</b>	<b>Epitopes</b>	<b>Espèces</b>	<b>Compartiments</b>	<b>Fournisseurs</b>
<b>Anti-calréticuline</b>	Calréticuline		Poulet	Reticulum endoplasmique	Abcam
<b>Anti 58K</b>	58K		Souris	Golgi	Abcam
<b>Anti EEA1</b>	EEA1	C-terminal	Lapin	Endosome précoce	Sigma Aldrich
<b>Anti LAMP1</b>	LAMP1	C-terminal	Lapin	Lysosome	SigmaAldrich
<b>Anti-TYRP1</b>	TYRP	C-terminal	Lapin	Melanosome Stade II	Sigma Aldrich

**Tableau 4 : Marqueurs compartimentaux**

<b>Anticorps</b>	<b>Protéines</b>	<b>Position de la fusion</b>	<b>Fournisseurs</b>
<b>Anti GFP</b>	GFP	C-terminal	Roche
<b>Anti PentaHis HRP</b>	6XHis	C-terminal	Qiagen

**Tableau 5 : Anticorps dirigés contre les protéines de fusion**

## II. CULTURE CELLULAIRE

### 1. Culture des bactéries

Les bactéries *E.coli* sont cultivées à 37°C en milieu LB (Luria Bertani) liquide, ou solide, obtenu par addition d'agar 2 % (m/v) (DIFCO) ou en milieu SOC lors de leur transformation.

- **Milieu LB** : Tryptone (DIFCO) 10 g/L, extrait autolytique de levures (BIOKAR) 5 g/L, NaCl 5 g/L. L'ampicilline ou la kanamycine sont utilisées respectivement à une concentration finale de 100 et 50 µg/mL. Ces antibiotiques permettent la sélection des bactéries préalablement transformées par un plasmide contenant le gène de résistance à l'ampicilline (gène codant la β-lactamase) ou la kanamycine (gène codant pour la kanamycine nucléotidyltransferase (KNTase)).

- **Milieu SOC** : Tryptone 2 %, extrait autolytique de levure 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM et glucose 20 Mm.

### 2. Culture des levures

En général, les levures sont cultivées à 27°C, en milieu liquide ou solide (agar DIFCO 2 % (m/v)).

- **Milieu YPG** : « Yeast Peptone » + glucose : milieu complet standard Peptone pepsique de viande (DIFCO) 10 g/L, extrait autolytique de levure (BIOKAR) 10 g/L, glucose 20 g/L.

- **Milieu YNB** : « Yeast Nitrogen Base » : milieu minimum standard « Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids and amonium sulfate» (DIFCO) 1,7 g/L, sulfate d'ammonium 5 g/L, glucose 20 g/L. Des acides aminés sont ajoutés si nécessaire à une concentration finale de 50 µg/mL.

Le promoteur *GALI* étant inductible par le galactose, les souches transformées par les plasmides pRS326-Gal1-MCS-GFP/6XHis sont cultivées dans un milieu contenant du raffinose 20 g/L comme source de carbone durant la pré-culture (YNBRaff). Après élimination du milieu de pré-culture, les souches sont transférées dans un milieu contenant du

galactose 40 g/L, permettant la synthèse de la protéine de fusion Pme117-GFP. Le choix du raffinose lors de la pré-culture s'explique par le fait que le glucose exerce un effet répresseur sur le promoteur *GALI*, avec pour conséquence un « délai » de l'induction de la protéine de fusion lors du transfert en milieu galactose.

Les milieux YPG et LB sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120°C et le milieu minimum YNB, durant 15 min à 110°C. Les solutions aqueuses (acides aminés) sont au préalable filtrées (filtre de 0,45 µm) avant d'être ajoutées après autoclavage.

En milieu liquide, la densité cellulaire est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm. A cette longueur d'onde, une unité de DO correspond soit à  $2 \cdot 10^7$  cellules pour les levures haploïdes, soit à  $10^9$  cellules pour les bactéries.

### 3. Culture des lignées cellulaires

#### a. Entretien des lignées

Les différentes lignées sont cultivées à 37°C sous une atmosphère humide formée de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95% d'air. Elles sont manipulées sous une hotte à flux laminaire et le milieu de culture contient de la pénicilline et de la streptomycine (GIBCO) à une concentration définie pour chaque type cellulaire. Les milieux de culture utilisés sont spécifiques d'une lignée cellulaire donnée et sont détaillés ci-après. Le repiquage des cellules s'effectue lorsqu'elles sont à 80% de confluence cellulaire. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules sont décollées en présence de trypsine/EDTA respectivement 250 µg/mL et 200 µg/mL (GIBCO) avec au préalable un rinçage d'une minute avec du DPBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>(GIBCO). Ensuite, l'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 10 ml de milieu de culture, puis alors centrifugé (1000 g, 5 min). Le culot est resuspendu dans du milieu de culture. Le comptage des cellules se fait sur cellule de Mallassez. La suspension cellulaire est diluée dans du milieu de culture en fonction de la densité cellulaire souhaitée puis réensemencée dans différents types de supports suivant les expérimentations à venir.

## b. Congélation et décongélation

La congélation des cellules permet le renouvellement du stock cryogénique. Les cellules sont trypsinées, puis lavées dans du milieu de culture et centrifugées (1000 g, 5 min). Le culot est suspendu à raison d'une concentration de 1 million de cellules par ml. Cette suspension cellulaire est agrémentée de DMSO à 10 % (Sigma-Aldrich) pour la cryoprotection puis 1 ml est distribué dans des cryotubes stériles. Les échantillons sont immédiatement placés sur glace, ensuite 48 h à -80°C, puis dans l'azote liquide (-195°C). Ils peuvent être ainsi conservés de nombreux mois.

La décongélation doit être rapide afin que les cellules restent le moins longtemps possible en contact avec le DMSO. Ainsi, dès que le contenu du cryotube se détache de la paroi, il est versé dans un tube contenant un grand volume de milieu de culture pour diluer le DMSO. La suspension cellulaire est immédiatement centrifugée (1000 g, 5 min) puis repris dans du milieu de culture.

## c. Composition des milieux de cultures

- **Milieu de culture des cellules COS7** : Milieu Dulbecco Modified Eagle Media (DMEM) avec GlutaMAX (GIBCO). Ce milieu est alors supplémenté avec du sérum de veau foetal décomplémenté à 10 % (SVF, GIBCO), de pénicilline à 50 000 U/L (GIBCO) et de streptomycine à 50 mg/L (GIBCO).

- **Milieu de culture des cellules CHO-K1** : Milieu Ham's F12 supplémenté de SVF décomplémenté à 10 % (GIBCO), de pénicilline à 100 000 U/L (GIBCO), de streptomycine à 100 mg/L (GIBCO) et de L-glutamine à 2 mM (Eurobio).

- **Milieu de culture des cellules Melan-a (GIBCO)** : Milieu advanced RPMI 1640 (GIBCO) supplémenté de SVF non décomplémenté à 10 % (GIBCO), de pénicilline à 100 000 U/L (GIBCO), de streptomycine à 100 mg/L (GIBCO), de L-glutamine à 2 mM (Eurobio), de tétradécanoyl phorbol acetate (TPA, Sigma Aldrich) à 200 nM, de rouge phénol à 7.5 µg/mL (Sigma Aldrich) et de HCl 10mM.

La culture des mélanocytes se fait en principe sous atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>. L'addition d'HCl 10 mM permet l'ajustement du pH du milieu RPMI pour une culture sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le pH va ainsi diminuer rapidement et le milieu de culture prend une teinte jaune (pH acide). Le pH est équilibré lorsque le milieu prend une teinte orange (pH 6.8-7.0) soit, en l'incubant à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, bouchon légèrement ouvert, toute une nuit, soit en injectant du CO<sub>2</sub> directement dans le milieu et dans ce cas le SVF est à rajouter après gazage.

### III. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### 1. Synthèse et amplification d'ADNc

##### a. Principe

La synthèse et l'amplification d'ADNc permettent d'analyser l'expression d'un gène dans un tissu ou un type cellulaire. Il faut pour cela extraire les acides ribonucléiques (ARN) totaux, puis les transcrire en ADN complémentaire (ADNc) et enfin amplifier cet ADNc par PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène d'intérêt. (Tableau 6)

##### b. Préparation d'ARN totaux de peaux

Les échantillons de peaux encore congelés sont découpés en petits morceaux d'environ 1 mm<sup>2</sup>, puis broyés au polytron (ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA®-WERKE). Le broyat est ensuite traité par le kit RNeasy Maxi Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La qualité et la quantité des ARN extraits sont analysées sur l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer et une puce Agilent RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies). Le marqueur utilisé est le RNA 6000 Ladder (Ambion).

##### c. Transcription inverse des ARN en ADNc

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir d'1 µg d'ARN total de peaux traité à la DNase, dans un volume final de 20 µL, avec 0,5 µg d'amorces oligo (dT) (Invitrogen) et la SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant. La réaction est incubée 50 min à 42°C et 15 min à 70°C pour dénaturer les structures secondaires de l'ARN. Les ADNc obtenus sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

### d. Réaction de polymérisation en chaîne

A partir de l'ADNc précédemment synthétisé, les gènes d'intérêts sont ensuite amplifiés par l'utilisation d'amorces spécifiques et de Taq polymérases. Essentiellement, deux types de Taq polymérases ont été utilisés, Expand High Fidelity PCR system (Roche) hautement fidèle, pour l'amplification d'ADN destinée aux constructions géniques et la PCR Mastermix (Thermoscientific) pour les amplifications d'ADN sur des colonies de bactéries ou de levures transformées.

Les mélanges réactionnels pour chaque type de Taq sont les suivants :

- **Expand High Fidelity PCR system**

50 µl qsp	}	Par tube
200 µM dNTP		
30 nM amorce sens		
30 nM amorce anti sens		
0,1 à 250 ng ADNc		
1X Tampon		
2.6 U Enzyme		

- **PCR Mastermix**

25 µL qsp	}	Par tube
1x PCR Mastermix		
30 nM amorce sens		
30 nM amorce anti sens		

Un contrôle négatif est effectué pour chaque réaction de PCR en substituant l'ADNc par de l'eau. L'amplification est effectuée selon le protocole suivant :

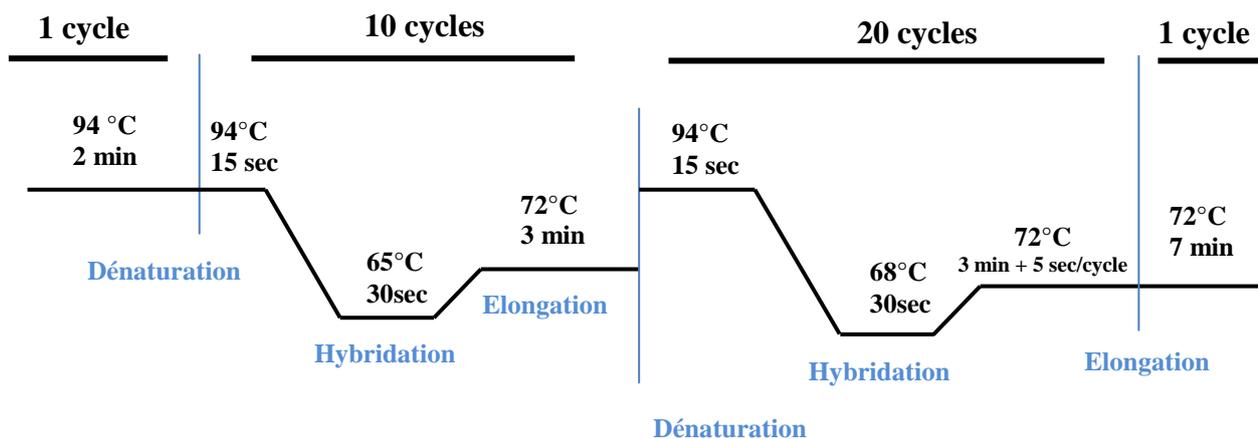


Figure 33 : Diagramme schématique de la réaction de PCR avec la Taq Expand High Fidelity PCR system

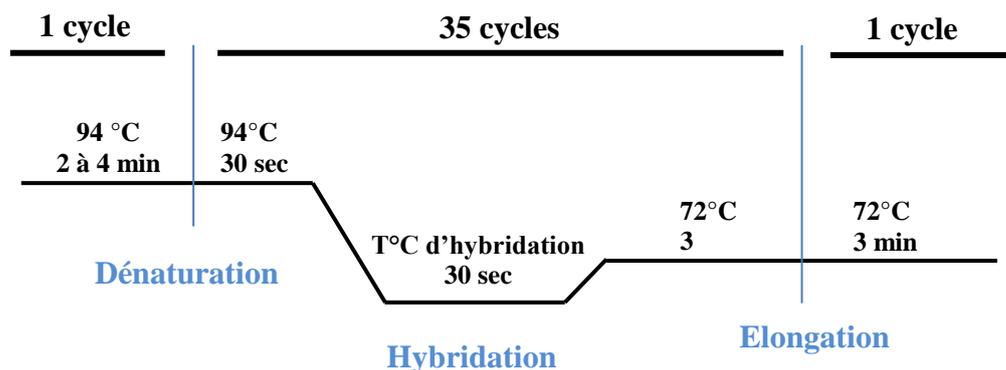


Figure 34 : Diagramme schématique de la réaction de PCR avec la Taq PCR Mastermix

### e. Séparation et purification des produits PCR par électrophorèse

Les acides nucléiques sont analysés par électrophorèse en condition non dénaturante sur gel d'agarose (0,8 à 2 % (p/v) selon la taille des fragments à analyser) contenant du bromure

d'éthidium (Bet 0.5 µg/ml, Biorad) et du tampon TAE 0,5 X (Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,5 mM, acétate de sodium 2,5 mM). Les produits PCR sont complétés par 0,5 volume de tampon de charge (glycérol 30 % (v/v), bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v). Un marqueur de taille (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) est déposé en regard des échantillons et permet d'estimer la taille des fragments d'ADN. La migration s'effectue à 10 V/cm de gel environ.

La bande correspondant à l'amplifiât d'ADN est isolée du gel à l'aide d'une lame de scalpel. Un système d'extraction (Qiaquick gel extraction kit, Qiagen) est utilisé pour séparer l'ADN du gel d'agarose.

## 2. Clonage d'ADNc

### a. Constructions géniques

La construction génique a pour but de cloner les ADNc bovins de Pmel17 issus des races Charolaises (mutant), Salers (sauvage) et Limousines (sauvage) dans les vecteurs d'expression destinés à des systèmes eucaryotes inférieurs (*Saccharomyces cerevisiae*) et supérieurs (COS7, CHO-K1 et Melan-a). Les vecteurs d'expression pRS326-Gal1-MCS-GFP et PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA permettent de réaliser une fusion traductionnelle en C-terminal respectivement avec la GFP et l'épitope V5 couplé à une étiquette 6XHis. Le vecteur TOPO XL PCR cloning vector quant à lui permet une ligation rapide et une amplification significative des produits PCR après transformation dans la souche Top10 (Invitrogen) d'*E.coli*.

Les ADNc de Pmel17 sont amplifiés avec des amorces spécifiques (Tableau 6) qui permettent l'addition de séquences correspondant aux sites de restriction XbaI et BamHI respectivement aux extrémités 5' et 3'. Ces ADNc sont ensuite clonés dans le vecteur pRS326-Gal1-MCS-GFP. Les vecteurs TOPO XL véhiculant les ADNc Pmel17 ainsi que les vecteurs pRS326-Gal1-MCS-GFP sont digérés avec les enzymes de restriction XbaI et BamHI (Invitrogen) à 37°C pendant 2h selon le protocole fourni par le fabricant. Cette double digestion permet d'une part, la libération des ADNc Pmel17 ainsi que la création de brins

cohésifs à leurs extrémités, ce qui facilite leurs ligatures ; et d'autre part, la linéarisation des vecteurs d'expression ciblent. Après digestion, les ADNc et les vecteurs sont séparés par électrophorèse puis purifiés.

La ligature des ADNc dans le vecteur d'expression pRS326-Gal1-MCS-GFP s'effectue avec l'enzyme T4 DNA ligase (10 U/ $\mu$ L, Invitrogen) selon le protocole fourni par le fabricant. La quantité de matériel génétique contenu dans le mélange vecteur/insert ne doit pas excéder 100 ng/ $\mu$ L. La réaction de ligature s'effectue à 16°C pendant 14 à 18 h suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min pour arrêter la réaction. Le vecteur pRS326-Gal1-MCS-6XHis est établi après ligature des ADNc dans le vecteur pRS326-Gal1-MCS-GFP. La GFP est excisée du vecteur à l'aide des enzymes BamHI et MfeI. L'étiquette correspondant à la polyhistidine est obtenue par hybridation directe des amorces spécifiques de cette séquence intégrant les sites de restriction BamHI et MfeI respectivement en 5' et 3'. Le mélange d'amorces (30  $\mu$ M final) est incubé 15 min à la température d'hybridation puis 15 min à température ambiante, la séquence polyhistidine obtenue est alors intégrée au vecteur par ligature.

La ligature des ADNc dans le vecteur PCDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA est réalisée en une seule étape, par insertion directe du produit PCR dans le vecteur linéaire. Le principe de l'insertion du produit PCR dans le vecteur est décrit et illustré en amont (Figure 30).

## **b. Transformation des bactéries**

La transformation est réalisée avec la souche bactérienne thermo-compétente Top10 (Invitrogen). 2  $\mu$ L de produits de ligature sont utilisés pour la transformation de 50  $\mu$ L de bactéries Top10 commerciales. Ce mélange est incubé 30 min sur de la glace avant de procéder à un choc thermique à 42°C dans un bain-marie pendant 30 sec puis transféré à nouveau 2 min sur la glace. 150  $\mu$ L de milieu de culture SOC sont rajoutés au mélange avant une incubation à 37°C sous agitation à 250 rotations par minute (rpm) pendant 1 h. Les bactéries transformées sont étalées sur du milieu de culture LB solide en présence d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) ou de kanamycine (50  $\mu$ g/ml) selon le marqueur de sélection porté par le vecteur, puis mises en culture à 37°C pendant une nuit. Les colonies résistantes sont criblées par PCR en utilisant une amorce interne à la séquence de l'insert et une amorce spécifique du site de clonage du vecteur. Les clones positifs sont ensemencés en milieu

liquide à raison de 3 ml de milieu LB par clone en présence d'antibiotiques et cultivés à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant une nuit. L'ADN plasmidique est extrait puis purifié le lendemain à partir de cette culture bactérienne.

### **c. Extraction et purification d'ADN plasmidique à partir de cultures bactériennes**

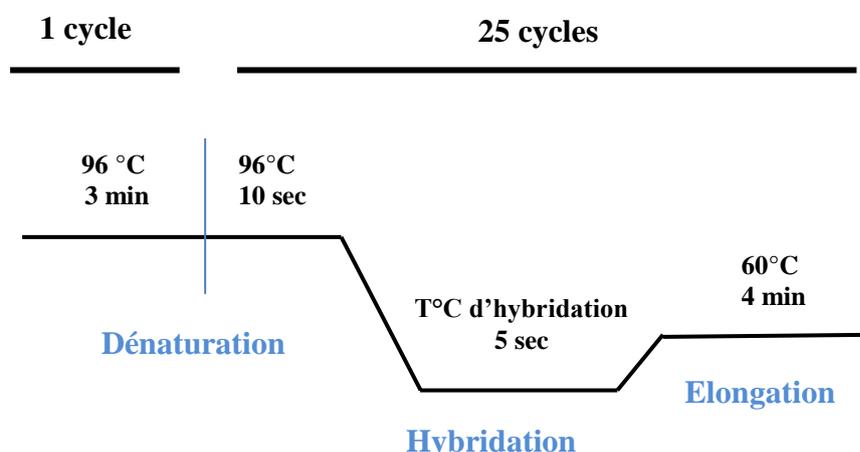
L'extraction et la purification d'ADN plasmidique ou miniprep est réalisée avec le kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), selon le protocole fourni par le fabricant. Les cellules bactériennes collectées par centrifugation (10 000g, 3 min) sont lysées avec un détergent en milieu alcalin (tampon P1 et P2), ce qui permet la libération et la dénaturation des ADN génomique et plasmidique. La solution est ensuite neutralisée (tampon N3), déclenchant un ré-appariement brutal des brins du duplex d'ADN. L'ADN chromosomique ne parvient pas à se ré-apparier complètement à cause de sa longueur (plusieurs méga paires de base), et forme des enchevêtrements insolubles. L'ADN plasmidique, plus court ( $\approx 10^3$  paires de base), réussit à se reformer et reste en conséquence en solution. Le précipité est séparé par centrifugation (10 000 g, 10 min), la majorité de l'ADN génomique ainsi que le précipitât protéique sont éliminés dans le culot, le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré puis placé sur colonne de silice à haute affinité pour les acides nucléiques. L'ADN plasmidique est concentré par centrifugation sur colonne (10 000g, 1 min) puis précipité et lavé par des bains d'éthanol (tampon PB et PE, 10 000g, 1 min) ce qui permet la dissolution des sels et la restitution des propriétés physico-chimiques de l'ADN. L'ADN plasmidique purifié est élué dans un volume de 50  $\mu$ L d'eau (1 min) et récupéré par centrifugation (10 000 g, 1 min). Les échantillons d'ADN plasmidique purifiés sont analysés par cartographie à l'aide des enzymes de restriction XbaI et BamHI pour confirmer la présence de l'insert. La quantité d'ADN plasmidique est estimée avec le spectrophotomètre Nanodrop ND 1000.

NOMS	SEQUENCES	POSITIONS
Sil-XbaI	5'- <u>TATCTAGA</u> AATGGATCTGGTGCTGAGAAAAT-3'	1-22
Sil 30	5'-CTCAGCTGCAGGCCTTGGATGGAAGGAACA-3'	659-689
Sil 5	5'-CTCACACTTACCTAGAGTCTGGCCCAGTCA-3'	830-860
Sil 32	5'- AAATACTAGCTCATTCATGCCTACAGAAGG-3'	1275-1305
Sil 34	5'-TCCCTGAGTCCCCTGCCGGATGACACTGCC-3'	1315-1345
Sil-BamHI	5'- <u>TAGGATCC</u> GACCTGCTGTCCACTGAGGAGG-3'	1950-1920
Sil 9	5'-GCCTTGTCTGTCCCGATGCTCAGTCCAGAC-3'	1479-1449
Sil31	5'-CTCACACTTACCTAGAGTCTGGCCCAGTCA-3'	1320-1290
Sil 33	5'-TGCCGGATGACACTGCCACCTTAGTCCTGG-3'	622-592
Sil 35	5'-TGCATTTGAGCTGACTGTGTCTTGCCAAGG-3'	468-438
AL-X326	5'-AACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTT-3'	
AL-E326	5'-TAAGTTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCAC-3'	
T7	5'-TAATACGACTCACTATAG-3'	
BGH	5'-CCTCGACTGTGCCTTCTA-3'	
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	
M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	
BamHI-6XHis	5'-GATCCCATCATCACCATCACCATGAC-3'	
MfeI-6XHis	5'-AATTGTCAATGGTGATGGTGATGATGG-3'	

**Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de Pmel17.** Les amorces sont répertoriées par couleur : amorces spécifiques de Pmel17, amorces spécifiques aux multi-sites de clonage des vecteurs 326, pcDNA3.1 et TOPOXL, amorces spécifiques de la séquence polyhisitidine. Les caractères soulignés correspondent aux sites de restriction des enzymes XbaI et BamHI.

#### d. Séquençage des échantillons d'ADN

Le séquençage des échantillons d'ADN d'intérêt est effectué selon le protocole mis au point au sein de l'unité UGMA UMR INRA 1061. La quantité d'ADN requise varie entre 200 et 400 ng et le mélange réactionnel est constitué de 3  $\mu$ l de Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem), 4  $\mu$ l de 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystem), 1  $\mu$ l d'amorces de séquençage 10  $\mu$ M et 2 % de DMSO (v/v). La réaction de séquençage est représentée par la Figure 35.



**Figure 35 : Diagramme schématique de la réaction de séquence**

Les produits de réaction de séquence sont ensuite purifiés sur colonne de Sephadex G50 super fine (Amersham) coulée dans des microplaques à fonds filtrants (Millipore). L'ADN ainsi obtenu est déshydraté à 94°C pendant 10 min et ensuite repris dans 10  $\mu$ l de formamide, puis dénaturé 3 min à 94°C pour faciliter la lecture. Les échantillons sont alors injectés dans la colonne pour analyse par le séquenceur 3130 genetic analyzer (Applied Biosystem).

## IV. METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

### 1. Transformation des levures

La méthode dite de l'acétate de lithium est celle utilisée pour la transformation des levures. L'acétate de lithium permet de décapier la paroi des levures et ainsi permettre par un choc thermique l'intégration du plasmide dans la cellule. Le plasmide utilisé doit être autonome pour se comporter comme un épisode, c'est-à-dire porter sa propre origine de réplication.

Une colonie de levures en culture sur milieu complet solide à 28°C depuis moins de 24 h est incubée 1 h à 28°C dans 2 mL d'une solution A (Acétate de lithium 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Sorbitol 1 M). Le culot cellulaire obtenu après centrifugation (9 000 g, 1 min) est repris dans 5 µL d'une solution contenant l'ADN plasmidique (300 à 600 ng) issu de la miniprep. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min. 2 mL de solution B (acétate de lithium 100 mM, polyéthylène glycol 4000 (m/v), EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM) sont ajoutés. Une incubation de 30 min à 28°C est réalisée, puis les cellules subissent un choc thermique de 5 minutes à 42°C. Elles sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 100 µL de solution C (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Sorbitol 0,6 M). La suspension cellulaire ainsi obtenue peut être immédiatement mise en culture par étalement sur le milieu sélectif solide adéquat. Les colonies transformées apparaissent au bout de 3 à 5 jours d'incubation à 28°C.

### 2. Transfection transitoire des cellules par lipofection

Les cellules COS7, CHO-K1 et Melan-a sont cultivées dans des flasques T75 (Greiner) et sont transfectées à partir de 80% de confluence. Avant la transfection, les cellules sont placées dans leurs milieux de culture respectifs, supplémentés uniquement en L- glutamine (en absence de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques). Les cellules sont transfectées avec le plasmide pCDNA 3.1 en présence de Lipofectamine LTX™ (Life Technology) ou de XtremeGENE 9 (Roche) dilué dans du milieu OptiMEM I™ (Life technology) pauvre en sérum selon un ratio lipofectant (µL) /ADN (µg) de 3:1. Dans notre cas, 30 µL de lipofectant pour

10 µg d'ADN ont été dilués dans un volume de 1 mL de milieu OptiMEM I. La solution de transfection est maintenue 30 min à température ambiante avant d'être déposée au goutte à goutte sur les cellules. Après une incubation de 6 h (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>), le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture complet et l'expression du gène *PMEL17* est mesurée à 24 h, 48 h et 72 h post-transfection.

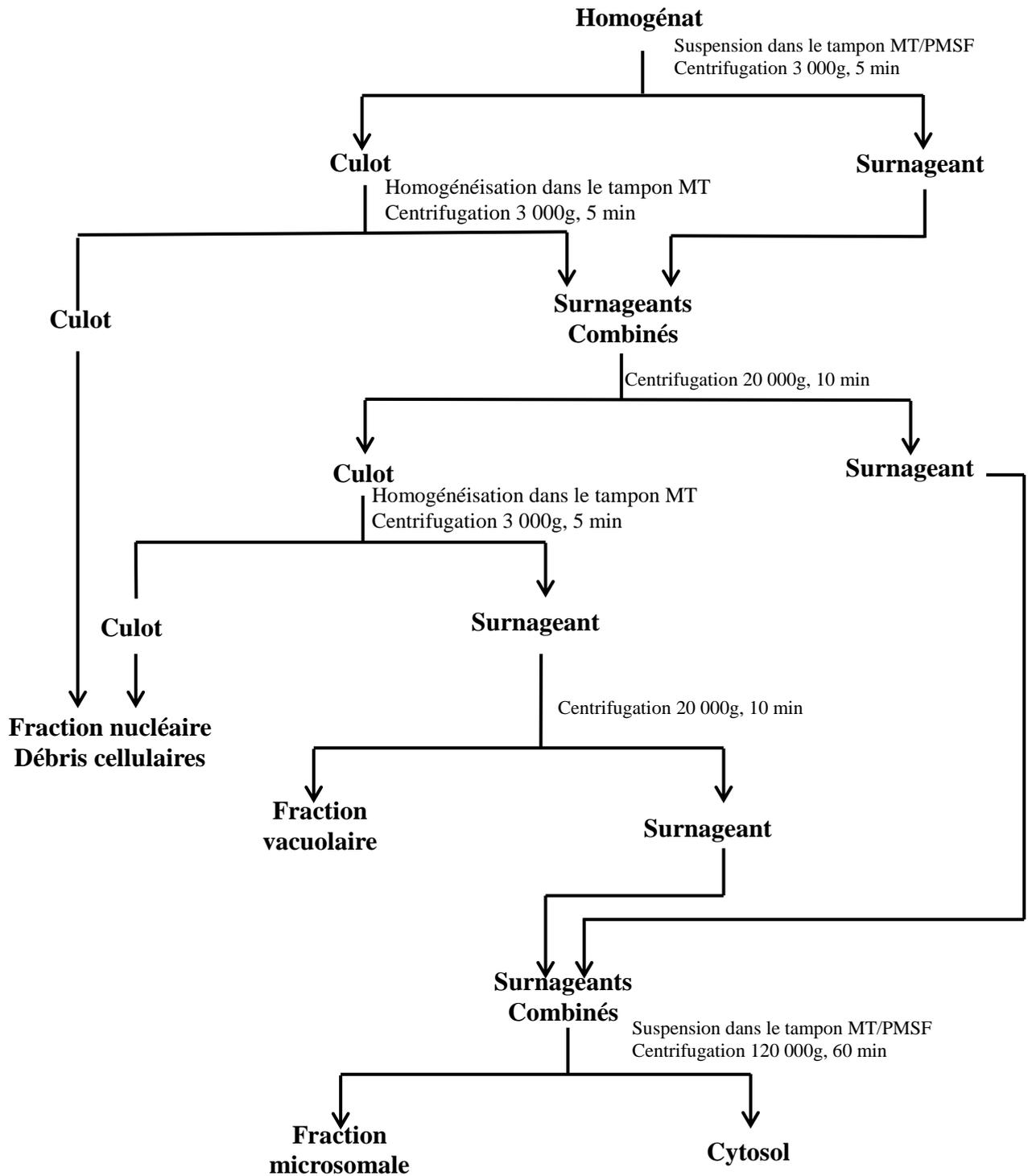


Figure 36 : Représentation schématique du fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle.

## V. METHODES DE BIOCHIMIE

### 1. Préparation d'extraits de protéines totales de levures

Cette préparation est adaptée de la méthode développée par Volland C. *et al.*, 1992 (Volland et al. 1992). Les protéines sont extraites à partir de  $2 \cdot 10^7$  cellules ( $DO_{600nm} = 1$ ). Les cellules sont centrifugées (3 000 g, 5 min) et le culot cellulaire est repris dans 500  $\mu$ L d'eau stérile. A cette suspension sont ajoutés 50  $\mu$ L de NaOH 1,85 M contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol 3,5 % (v/v) suivi d'une incubation à 4°C pendant 10 min. Les protéines sont ensuite précipitées par addition de 50  $\mu$ L d'Acide Trichloro-Acétique (TCA) à 50 % (m/v). Après incubation pendant 10 min à 4°C et centrifugation à 14 000 g pendant 10 min à température ambiante, le culot protéique obtenu est remis en solution dans 20  $\mu$ L de Tris 1 M, auxquels sont ajoutés 10  $\mu$ L de tampon d'échantillon d'électrophorèse contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol 5 % (v/v) (Laemmli, U.K., 1970). Cette remise en suspension est optimisée par traitement de l'échantillon pendant 2 min dans un bain à ultrasons (Vilber Lourmat), et une incubation de 10 min à 37°C.

### 2. Fractionnement subcellulaire sur levures

Le fractionnement subcellulaire est effectué selon le protocole décrit par Zinser *et al* (Zinser et al. 1991). Les fractions cellulaires sont obtenues après digestion de la paroi cellulaire des levures par la cytohélicase ( $\beta$ -(1.3)-D-glucanase, SEPRACOR, France).

Les cellules en phase exponentielle de croissance (50 à 100 mL de culture) sont recueillies par centrifugation (3000 g, 5 min) puis remises en suspension dans du tampon (Sorbitol 1 M, DTT 50 mM, EDTA 25 mM, pH 7.5). Après une incubation de 15 min à 20°C, les cellules sont centrifugées et lavées deux fois dans une solution de sorbitol 1 M. Remises en suspension dans du sorbitol 1 M en présence de cytohélicase (77 U.I), elles sont alors incubées 1 h à 30°C. Les sphéroplastes sont récupérés par centrifugation (4000 g, 5 min) et lavés deux fois avec du sorbitol 1 M. Ils sont alors repris dans du tampon MT (Mannitol 0.6 M, Tris 10 mM, pH 7.4) additionné de PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluor) 1 mM final

pour inhiber les protéases à sérine. Les levures sont alors broyées au vortex avec des billes de verre (0.45-0.5 mm, lavées à l'acide) dans un rapport de 3 g de billes par g de levures. Un broyage d'1 min suivi d'un repos de 5 min dans la glace est répété 5 fois, puis l'homogénat est centrifugé (500 g, 5 min) pour éliminer les billes et les cellules non broyées. La séparation des fractions nucléaire, vacuolaire, microsomale et cytosolique est réalisée par des centrifugations différentielles à 4°C (Figure 36).

### **3. Préparation d'extraits de protéines totales à partir de tissu (peaux) et de cellules de mammifères**

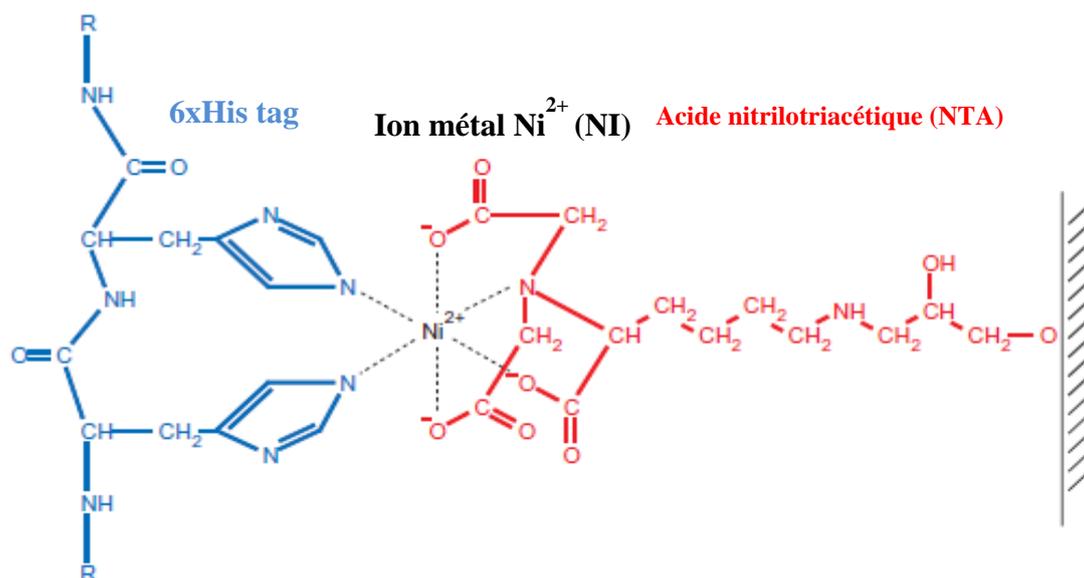
L'extraction est réalisée sur des échantillons de peaux conservés à -80°C et sur des cellules en culture après transfection. Le tampon de lyse utilisé pour l'extraction est le RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630, désoxycholate de sodique 0.5 %, SDS 0.1 %, pH 8) auquel est rajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Le volume de RIPA requis pour la solubilisation des protéines est de 50 µL par mg de tissu ou par million de cellules. Les échantillons de peaux (400 à 600 mg) sont broyés au polytron (ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA®-WERKE) dans le tampon RIPA exclusivement à 4°C afin de minimiser la dégradation des protéines. Les extraits protéiques (peaux et cellules) sont homogénéisés par un passage à travers l'aiguille d'une seringue (taille 23G) puis incubés à 4°C sous agitation pendant 1 h. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé (10 000 g, 4°C, 10 min). Le surnageant est alors prélevé et la quantité totale de protéines contenues dans le lysat est évaluée par la méthode de Bradford (décrite ultérieurement).

### **4. Purification de protéines étiquetées au 6XHis**

#### **a. Principe**

La purification des protéines est réalisée en condition non dénaturante. Cette méthode utilise des billes d'agarose NI-NTA (Qiagen) capables de capter les protéines portant une étiquette 6XHis. Ces billes sont composées de particules magnétiques avec un fort pouvoir chélateur pour les groupements nitrilotriacétique (NTA) liés de manière covalente à leur

surface et sont préchargées avec du nickel (Ni). Le complexe Ni-NTA forme une matrice qui chélate le 6XHis par affinité métallique pour l'ion nickel  $\text{Ni}^{2+}$  (Figure 37).



**Figure 37 : Réaction de chélation de la polyhistidine par la matrice NI-NTA.**

## b. Lyse cellulaire

Les cellules sont collectées par centrifugation (1 000 g, 5 min) dans une solution de PBS (GIBCO) contenant de l'EDTA (0.53 mM) et de la trypsine (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 72 h post-transfection. Après 2 lavages au PBS (centrifugation 1 000 g, 5 min), le culot cellulaire est mis en suspension dans du tampon de lyse à raison de 1 mL de tampon pour  $10^7$  cellules ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, Tween 20 0.05 %, pH 8). Au tampon de lyse est additionné un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free protease inhibitor, Roche). Les cellules sont lysées par 3 cycles consécutifs de congélation sur carboglace et décongélation à température ambiante.

### **c. Capture des protéines**

Le lysat cellulaire est centrifugé (10 000 g, 4°C, 10 min) afin d'éliminer l'ADN ainsi que les débris cellulaires. 50 µL de billes magnétiques NI-NTA sont rajoutés au surnageant puis, cette suspension est placée sous agitation circulaire sur roue à 4°C pendant 2 h afin de permettre la chélation de la protéine de fusion Pmel17-6XHis par la matrice NI-NTA.

### **d. Elution**

La suspension (lysat cellulaire et bille NI-NTA) est placée sur un portoir magnétique pendant 1 min (QIAGEN 12-tube Magnet) pour permettre le culottage des billes NI-NTA vers le fond du tube et donc leurs séparations du lysat cellulaire. Une fois le lysat collecté, les billes sont lavées par 3 bains successifs dans du tampon de lavage (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, Tween 20 0.05 %, pH 8). A chaque lavage, la stringence du tampon est augmentée en doublant le contenu en imidazole dans le but d'éliminer les protéines endogènes avec des résidus His pouvant interférer avec la matrice NI-NTA.

## **5. Dosage protéique**

Le dosage protéique est réalisé selon le protocole décrit par Bradford (Bradford 1976). Une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin) allant de 0 à 25 µg/ml de protéines est réalisée dans de l'eau, dans un volume final de 1 ml. Les essais sont également dilués dans l'eau. Le réactif de Bradford est ajouté (1 ml final) à chaque essai, avant agitation et lecture de l'absorbance à 595 nm. La concentration protéique de chaque échantillon est estimée par référence aux droites étalons obtenues avec la gamme de BSA, après élimination de la valeur de l'absorbance du témoin blanc ne contenant que de l'eau et du réactif de Bradford.

## 6. Western blotting

La méthode d'analyse des protéines par Western blotting comporte 3 étapes distinctes après préparation des extraits protéiques (Burnette 1981).

### a. Electrophorèse des protéines

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante selon la méthode de Laemmli (Laemmli 1970). Le gel de séparation est un gel à 10 % ou 12 % d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5/1) (m/v) dans un tampon Tris 0,375 M, pH 8,8, renfermant du SDS 0,1 % (m/v), du TEMED 0,1 % (v/v) et du persulfate d'ammonium 0,049 % (m/v). Le gel de concentration des échantillons est un gel à 5 % d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5/1) (m/v) dans un tampon Tris 0,125 M, pH 6,8, renfermant du TEMED 0,1 % (v/v), du persulfate d'ammonium 0,06 % (m/v) et du SDS 0,1 % (m/v). L'électrophorèse est effectuée avec un appareil vertical Mighty Small II (Hoefer). Le tampon de migration est un tampon Tris 25 mM contenant de la glycine 0,192 mM et du SDS 0,1 % (m/v).

Les échantillons protéiques ainsi qu'un marqueur de masse moléculaire pré-coloré (Fermentas, PageRuler™) sont soumis à l'électrophorèse. La migration est réalisée pendant 3 à 5 h sous une tension constante de 70 mV.

### b. Electrotransfert des protéines

L'électrotransfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham®), à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec TE 70 PWR (Amersham). Le transfert est effectué pendant 90 min à une intensité maximale de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> de membrane, dans un tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 10 % (v/v).

### c. Immuno-révélation des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose par la méthode ECL™

La membrane de nitrocellulose est immergée pendant 1 h dans du tampon TBST-L (tampon Tris 10 mM, pH 8 contenant du NaCl 0,15 M, du Tween 20 à 0,5g/L et du lait en

poudre écrémé à 25 g/L). Les protéines du lait vont saturer les sites non spécifiques sur la membrane de transfert. Celle-ci est ensuite incubée dans une solution de TBST-L avec des anticorps mono ou polyclonaux (anticorps primaires) dirigés spécifiquement contre les protéines d'intérêt durant 16 h à 4°C. La membrane est rincée dans du TBST (sans lait écrémé) puis incubée durant 1 h dans du TBST-L contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase. La réaction catalysée par cette enzyme permet ainsi de détecter la protéine ciblée par l'anticorps primaire, après incubation de la membrane avec un substrat chimioluminescent (ECL™, Amersham®) capable d'impressionner un film photographique (Kodak®). La membrane peut être incubée séquentiellement avec différents anticorps primaires, après avoir été préalablement nettoyée des anticorps primaires et secondaires par incubation dans une solution de « stripping buffer » ( $\beta$ -mercaptoéthanol 100 mM (v/v), SDS 2 % (v/v), Tris 62.5 mM pH 6,7), à 50°C, pendant 30 min, selon les instructions fournies par le fabricant de la membrane (Amersham/Kodak®).

## VI. METHODE DE MICROSCOPIE CONFOCALE

### 1. Préparation des coupes de peaux

Les coupes sont réalisées au cryostat (Leica CM3050S) à partir d'échantillons de peaux congelés imbibés de Tissu Tek O.C.T (VWR) permettant leur fixation au dispositif. Des sections transversales de 5  $\mu\text{M}$  d'épaisseur permettant de conserver l'organisation structurale de la peau (épiderme, derme, hypoderme) sont immédiatement déposées sur des lames superfrost (Thermoscientific), qui par leurs charges positives exercent une attraction électrostatique qui facilite l'adhérence du tissu. Les coupes sont ensuite conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une utilisation ultérieure.

### 2. Triple immunomarquage

Les coupes de peaux conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  sont séchées à température ambiante pendant 45 min avant d'être fixées avec une solution de méthanol pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après séchage 15 min à température ambiante, les coupes sont lavées par trois bains successifs de 5 min dans du PBS puis plongées 10 min dans du tampon de démasquage antigénique (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0.05 % v/v pH 9) porté à  $95^{\circ}\text{C}$ . Les coupes sont alors refroidies à température ambiante pendant 15 min puis lavées par trois bains de 5 min dans du PBS avant d'être incubées pendant 30 min avec une solution de perméabilisation (PBS, Triton X-100 0.5 %). Après trois bains de 5 min dans du PBS, les coupes sont incubées pendant 1 h avec une solution de saturation contenant du PBS et du *Normal Serum* 5 % (GIBCO) issu de la même espèce que l'anticorps secondaire qui sera utilisé. Les protéines contenues dans le sérum vont saturer les sites non spécifiques pouvant générer du bruit de fond. Les coupes de peaux sont délimitées avec un stylo hydrophobe (Dako pen) permettant les dépôts de liquide sur les lames sans bavure. Les coupes sont incubées avec un anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 3 % de *Normal Serum* pendant 16 h à  $4^{\circ}\text{C}$ . Trois lavages de 5 min avec du PBS sont effectués avant une incubation d'1 h à température ambiante à l'obscurité avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome alexa488 ou alexa594 dilué dans du PBS contenant 3 % de *Normal Serum*. Toutes les incubations par la suite sont réalisées à l'obscurité. Après lavage et une nouvelle saturation, les coupes sont incubées

séquentiellement avec les deuxièmes anticorps primaires et secondaires comme décrit ci-dessus. Elles sont ensuite couvertes par une lamelle avec une solution de montage contenant du Dapi qui marque les noyaux cellulaires (Fluoroshield® Sigma Aldrich). Un délai de 24 h après le montage est requis avant l'analyse en microscopie confocale. Les coupes marquées peuvent être conservées à 4°C à l'obscurité pendant 3 mois.

### **3. Analyse en microscopie confocale**

Les analyses ont été effectuées avec un microscope confocal MSL 510 (Zeiss Axiovert 200M, LePecq, France). Le Dapi, les fluorochromes alexa488 et alexa594 sont excités respectivement à des longueurs d'onde de 405 nm, 488 nm et 594 nm. Les images ont été mises en forme grâce au logiciel LSM Image Browser (Zeiss) et celles présentées dans ce manuscrit ont été obtenues à un grossissement 400 X (oculaire 10X et objectif 40X).

*RESULTATS-DISCUSSION*

Plusieurs études ont révélé l'existence d'une association entre l'allèle (*si*) et la dilution totale de la coloration de la robe du bovin Charolais (Oulmouden et al. 2005; Gutierrez-Gil et al. 2007; Kuhn and Weikard 2007). Cette association implique un rôle de la protéine Pmel17 dans la phéomélanogenèse chez l'espèce *Bos taurus*. En effet, les individus de génotype *Extension (e/e)* comme c'est le cas pour le bovin Charolais ont en principe un patron de coloration plutôt phéomélanique. Par ailleurs, l'association entre l'allèle *si* et une dilution de la coloration eumélanique a été établie (Gutierrez-Gil et al. 2007; Kuhn and Weikard 2007).

A ce jour, il n'existe aucune preuve fonctionnelle relative à l'allèle (*si*) du gène *SILVER/PMEL17*. La proximité de la mutation Charolaise par rapport au site de clivage du peptide signal ainsi que le changement d'hydrophobicité qu'elle engendre, nous amènent à émettre l'hypothèse d'une inhibition du clivage du peptide signal conduisant à une perte de fonction de la protéine Pmel17 (Figure 38). Cette inhibition aurait pour conséquence la rétention de la protéine Pmel17 dans le RE. Ainsi, l'élaboration fonctionnelle de la matrice du mélanosome n'aurait pas lieu et ce dernier resterait bloqué à son premier stade de la biogenèse (stade pré-mélanosome) sous forme de vésicules non fonctionnelles.

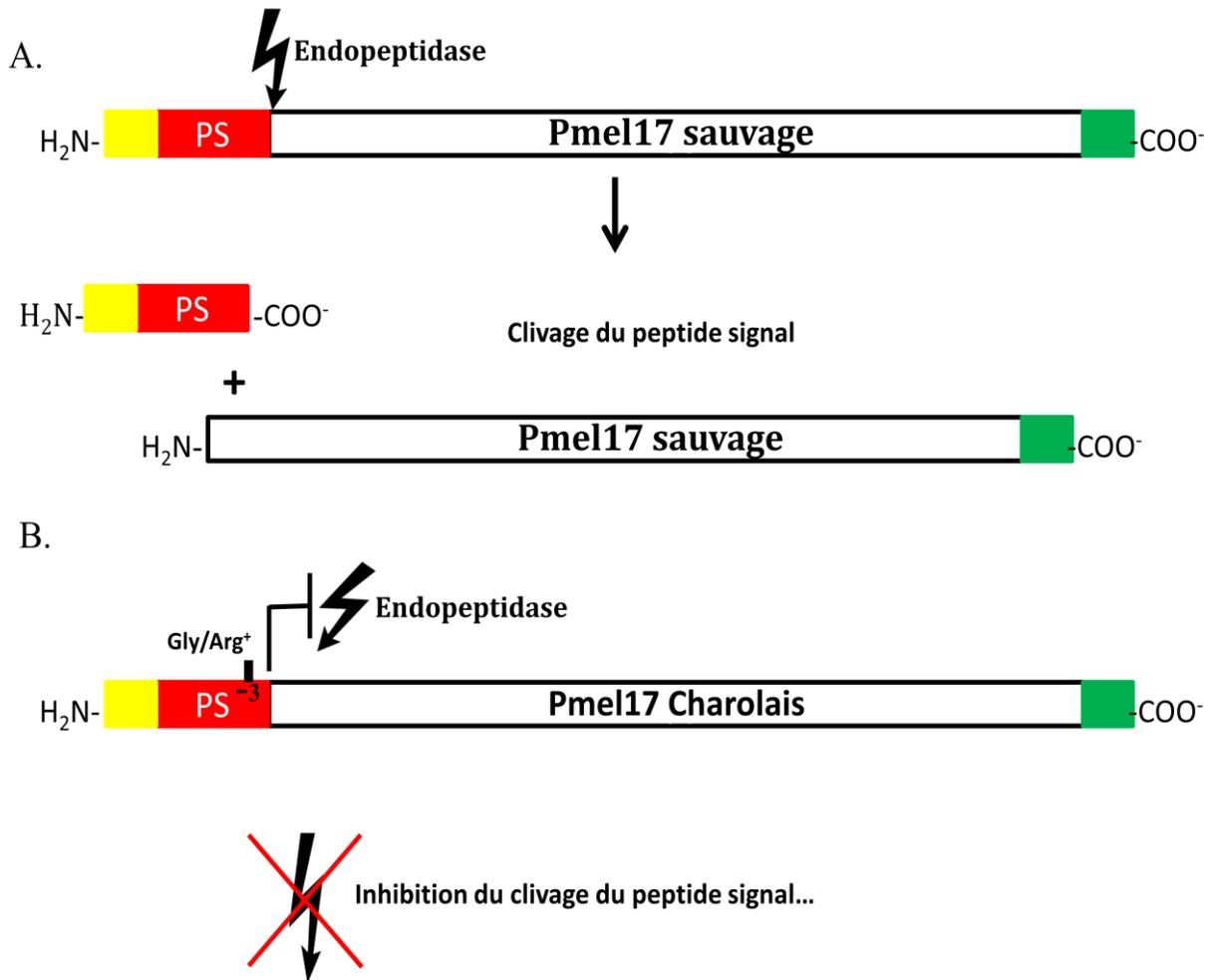
## I. STRATEGIES MISES EN PLACE

Notre démarche vise à apporter des preuves fonctionnelles relatives à l'allèle Charolais (*si*) du gène *SILVER/PMEL17*. Celle-ci a consisté en deux approches *in situ* et *in vitro*.

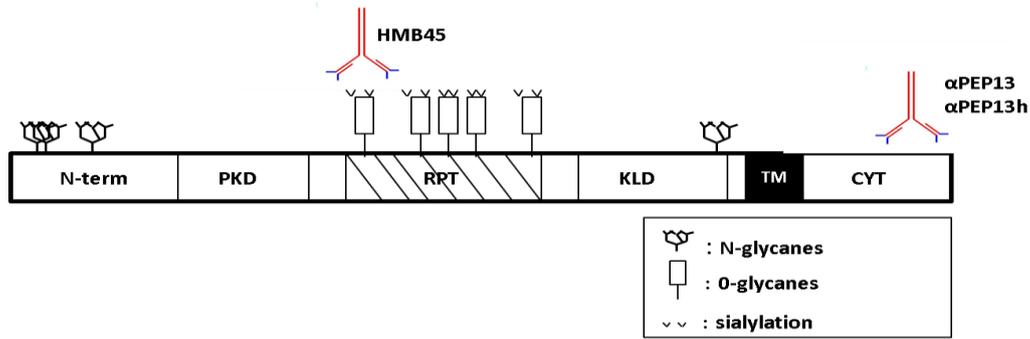
Dans l'approche *in situ*, deux stratégies ont été mises en place. La première stratégie a consisté à vérifier l'hypothèse de la rétention du variant Pmel17 dans le RE, par des analyses western blotting avec des anticorps reconnaissant la protéine Pmel17 sous différentes formes à différents stades de sa maturation. La deuxième stratégie a eu pour but la localisation subcellulaire du variant Pmel17 par des marquages immunohistochimiques utilisant les anticorps spécifiques de la protéine Pmel17 et des marqueurs des différents compartiments de sa voie de sécrétion.

L'approche *in vitro* vise à élucider les mécanismes moléculaires associés à la mutation charolaise qui affectent l'adressage de Pmel17 au mélanosome. La stratégie mise en place a consisté à exprimer le variant et l'isoforme sauvage de la protéine Pmel17 dans des systèmes cellulaires permettant l'évaluation fonctionnelle de ce variant.

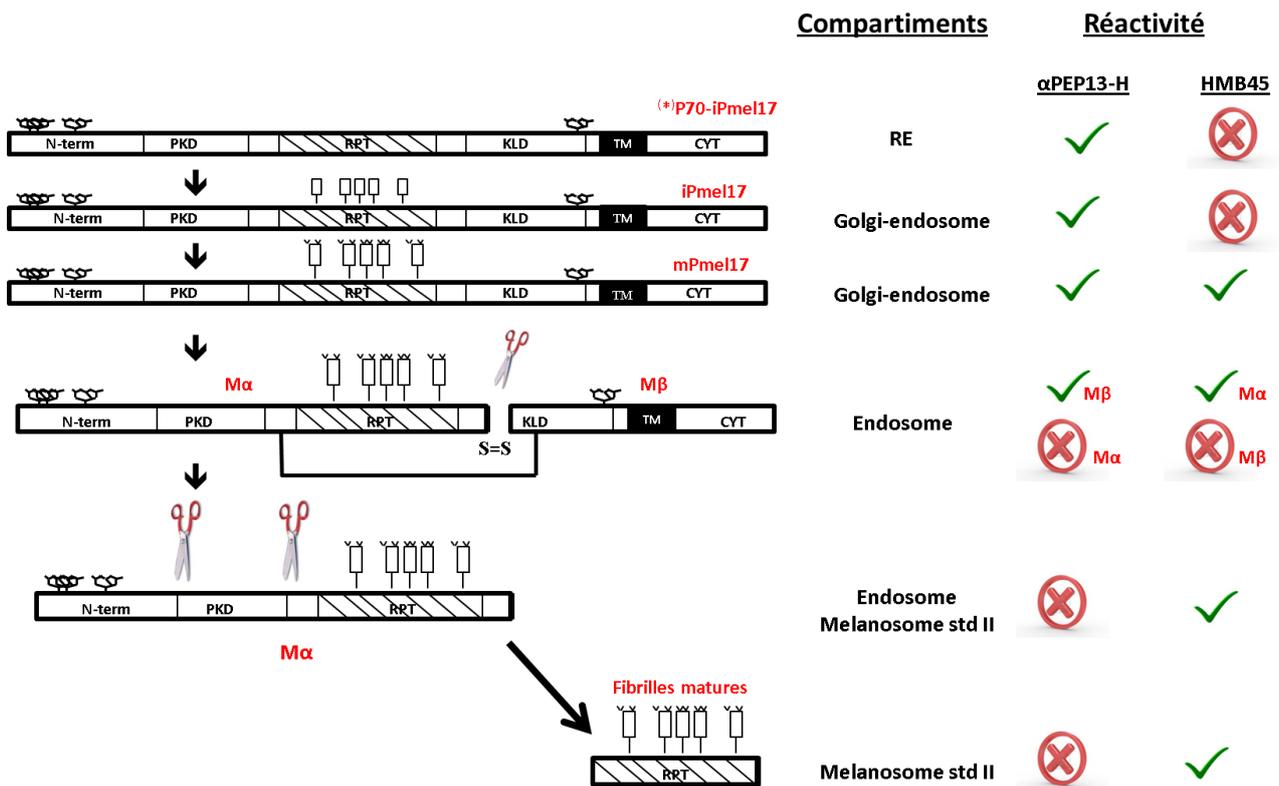
Les données résultant de ces différentes approches sont analysées et discutées à travers 3 grandes parties (III, IV, V) : III) Détection de la protéine Pmel17 Charolaise à partir d'extraits protéiques de peaux ; IV) Localisation subcellulaire de la protéine Pmel17 Charolaise ; V) Expression de la protéine Pmel17 Charolaise au sein de différents modèles cellulaires. Ces 3 parties sont précédées (II) d'une description des différents anticorps spécifiques de la protéine Pmel17 utilisés dans cette étude.



**Figure 38 : Schéma du clivage du peptide signal.** A) Cas de la protéine sauvage, B) Cas de la protéine Charolaise mutée : inhibition de l'activité de l'endopeptidase par la présence de la mutation en position -3 du site de clivage du peptide signal (PS).



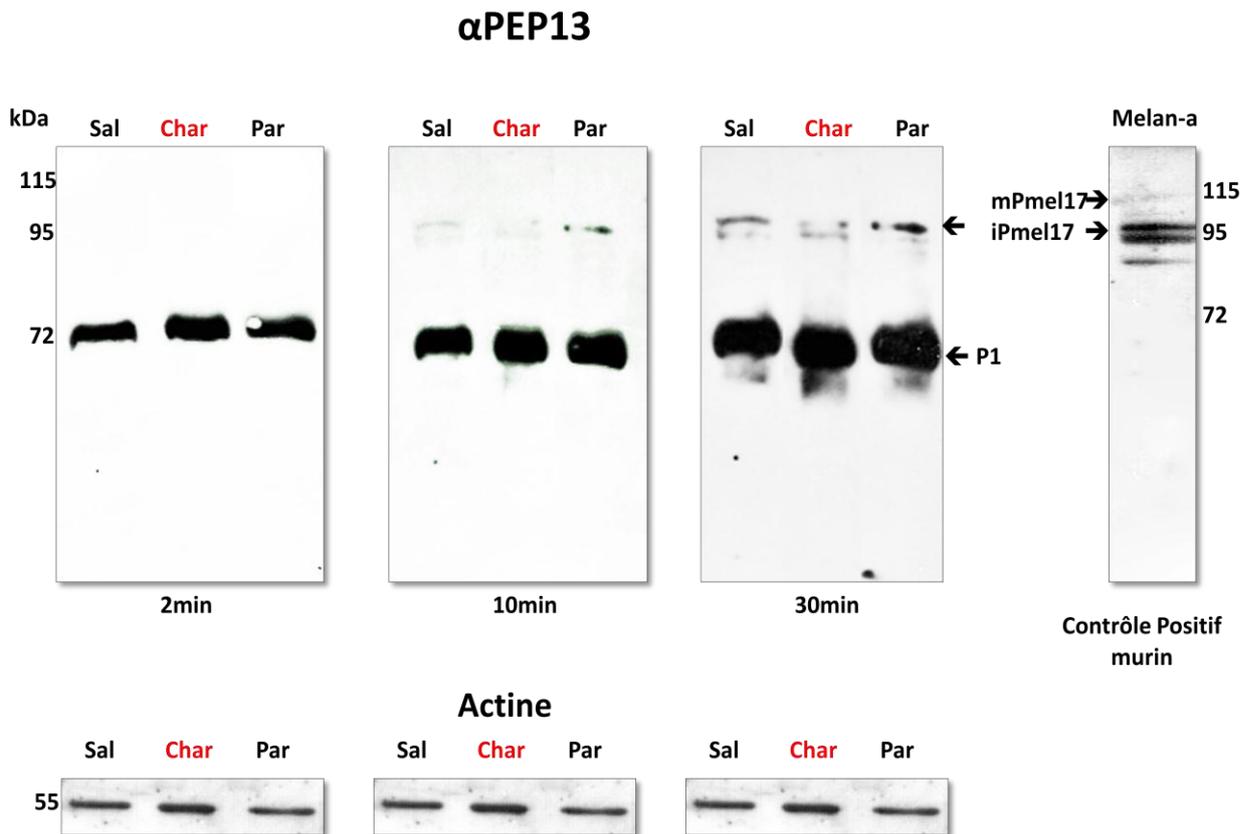
**Figure 39 : Diagramme schématique de la structure primaire de la protéine Pmel17 sauvage** (Harper et al. 2008). Ce diagramme indique les différents domaines protéiques, les sites de N-glycosylation connus, les sites connus et putatifs d'O-glycosylation ainsi que les sites de liaison des anticorps utilisés dans cette étude. Il faut noter que la liaison de HMB45 à son épitope requiert la sialylation des résidus O-glycans à proximité de cette région. **N-term**: N-terminal domain; **PKD**: Polycystic Kidney disease-like Domain; **RPT**: Proline Threonine Rich-domain; **KLD**: Kringle-Like Domain; **TM**: Transmembrane domain; **CYT**: cytoplasmic domain.



**Figure 40 : Diagramme schématique des différents isoformes de Pmel17** (Harper et al. 2008), indiquant le compartiment dans lequel chaque forme est localisée et l'anticorps avec lequel il interagit. Les ciseaux indiquent les événements de clivage, la barre indique un/des ponts disulfures entre les formes M $\alpha$  et M $\beta$ , les résidus cystéines contribuant à la formation de ce/ces ponts n'étant pas connus. Les fibrilles matures du mélanosomes de stade II peuvent se composer du domaine RPT seul ou associé au domaine PKD. (\*)P70 correspond à la forme néosynthétisée de Pmel17 reconnue par  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h au sein de certains types cellulaires décrits dans la partie III.4.

## II. ANTICORPS SPECIFIQUES DU NIVEAU DE MATURATION DE LA PROTEINE

Au cours de cette étude, trois anticorps spécifiques de la protéine Pmel17 ont été utilisés :  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h dirigés respectivement contre les protéines murine et humaine (gracieusement fournis par le Pr Vincent Hearing, National Institute of Health NIH, Bethesda USA) et l'anticorps HMB45 spécifique de la protéine murine (Figure 39). Ces anticorps reconnaissent Pmel17 sous différentes formes à différents stades de sa maturation (Figure 40). Les anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h reconnaissent Pmel17 sous trois formes : la forme immature iPmel17/P1/P100 ( $\approx$  95 kDa), la forme mature mPmel17/P2/P120 ( $\approx$  115 kDa) spécifiques respectivement des compartiments Golgi et pré-mélanosome (endosome), ainsi que le fragment M $\beta$ /P26 ( $\approx$  26 kDa) spécifique du pré-mélanosome (Yasumoto et al. 2004; Harper et al. 2008). Le fragment M $\beta$  résulte du clivage de la forme mPmel17 par une protéine convertase au sein du pré-mélanosome (Berson et al. 2001; Yasumoto et al. 2004). L'anticorps HMB45 quant à lui reconnaît essentiellement les fibrilles matures ( $\approx$  35 kDa) du mélanosome de stade II (Berson et al. 2001; Kushimoto et al. 2001; Raposo et al. 2001) et dans une moindre mesure M $\alpha$  ( $\approx$  85 kDa), l'autre fragment issu du clivage de mPmel17 (Hoashi et al. 2006; Valencia et al. 2007; Harper et al. 2008).



**Figure 41 : Profil de détection western blotting avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13 sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines de races Charolaise (**Char**), Parthenaise (**Par**) et Salers (**Sal**) comparé à celui d'extraits protéiques de mélanocytes murins. L'analyse comparée des différents profils permet d'identifier les bandes qui correspondent aux formes P70 ( $\approx$  70 kDa), mPmel17 ( $\approx$  115 kDa) et iPmel17 ( $\approx$  95 kDa) indiquées par des flèches. Le western blotting avec l'anticorps anti actine sert de contrôle de la quantité de protéines chargées pour chacun des échantillons. Les temps indiqués sous les profils western blotting correspondent à la durée d'exposition de la membrane de nitrocellulose avec le film autoradiographique.**

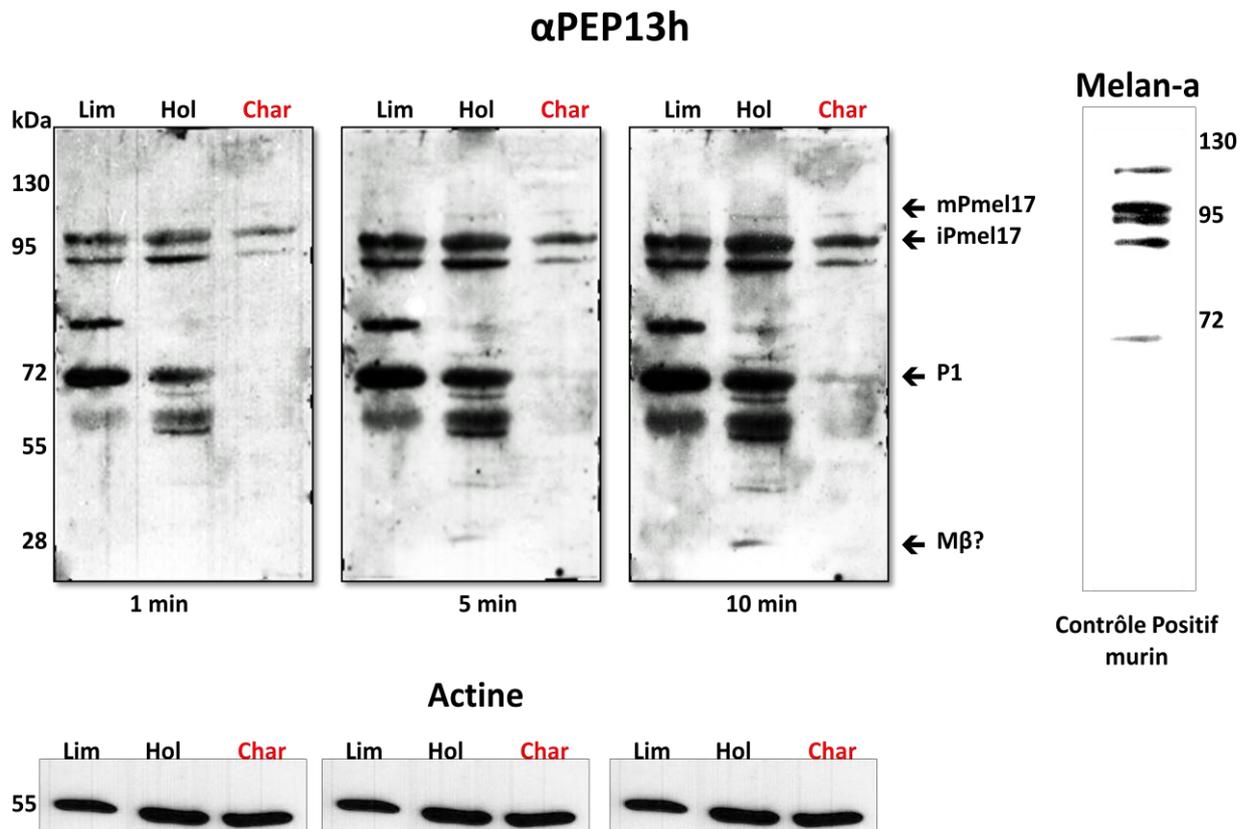
### III. DETECTION DE LA PROTEINE PMEL17 CHAROLAISE A PARTIR D'EXTRAITS PROTEIQUES DE PEAUX

Les analyses de détection de Pmel17 sont réalisées par western blotting, elles ont pour but de vérifier l'hypothèse de la rétention du variant Pmel17 dans le RE. Ces analyses sont réalisées avec les anticorps  $\alpha$ PEP13,  $\alpha$ PEP13h et HMB45 sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines provenant de race Charolaise ainsi que des extraits contrôles, provenant de races Salers, Limousine, Prim'Holstein, Parthenaise, de génotype sauvage pour le gène *PMEL17*. Les races Salers et Limousine à l'instar de la race Charolaise sont porteuses de l'allèle récessif *e* au locus *Extension*, responsable de leur phénotype phéomélanique. La race Prim'Holstein est porteuse de l'allèle dominant  $E^D$ , responsable du phénotype noir, tandis que la race Parthenaise est porteuse de l'allèle sauvage  $E^+$ , permettant toutes les combinaisons de coloration du rouge au rouge/brun et noir.

#### 1. Analyses en western blotting avec l'anticorps $\alpha$ PEP13

Les analyses de détection en western blotting utilisant l'anticorps  $\alpha$ PEP13 sont réalisées sur des extraits protéiques de peaux de bovins de race Charolaise, Salers et Parthenaise. Ces analyses ne montrent pas de différence de profil de détection protéique entre les échantillons provenant des différentes races (Figure 41) : trois bandes sont détectées pour chacun des extraits analysés. La première bande d'un poids moléculaire de 70 kDa est détectée au bout de deux minutes d'exposition, les deux autres bandes très proches en termes de poids moléculaire  $\approx 90$  et  $\approx 95$  kDa sont détectées à partir de dix minutes d'exposition et atteignent une intensité maximale de signal au bout de trente minutes d'exposition. La bande à 70 kDa que nous appelons P70 correspond à la forme native de Pmel17 spécifique du RE sans ou avec très peu de modifications post-traductionnelles. Cette bande est celle qui présente le signal de détection le plus intense au sein du profil western blotting. Ce signal est sensiblement équivalent entre protéines Pmel17 sauvages et variant charolais. Le signal correspondant aux bandes à  $\approx 90$  kDa et  $\approx 95$  kDa ne présente pas non plus de différence significative entre protéines Pmel17 sauvages et variant Charolais. La proximité entre ces deux bandes laisse supposer qu'il pourrait s'agir respectivement des formes iPmel17 et

mPmel17. Cette hypothèse est cependant contredite par deux aspects. Le premier aspect est que la forme la plus lourde  $\approx 95$  kDa montre un signal de détection plus intense que la forme plus légère  $\approx 90$  kDa, or il est démontré que la forme immature iPmel17 est la forme majoritaire de la protéine Pmel17 et qu'une très légère fraction ( $\leq 5\%$ ) de cette protéine est transformée en forme mature mPmel17 (Valencia et al. 2007). Le deuxième aspect est que les formes I et mPmel17 ont respectivement des poids moléculaires théoriques de 95 kDa et 115 kDa. La bande à  $\approx 95$  kDa correspondrait donc à la forme iPmel17, celle à 90 kDa correspondrait à du marquage aspécifique. D'ailleurs, la spécificité de l'anticorps  $\alpha$ PEP13 a été vérifiée en comparant le profil western blotting obtenu à partir des extraits protéiques de peaux à celui du profil western blotting obtenu avec le même anticorps sur des extraits protéiques provenant de mélanocytes murins (cellules Melan-a). Le profil de détection est similaire pour la bande correspondant au poids moléculaire d'iPmel17 ( $\approx 95$  kDa), mais aussi pour celle à  $\approx 90$  kDa. Sur le profil western blotting correspondant à l'extrait protéique de mélanocytes murins, la forme mPmel17  $\approx 115$  kDa ainsi qu'une bande de  $\approx 80$  kDa sont détectées.



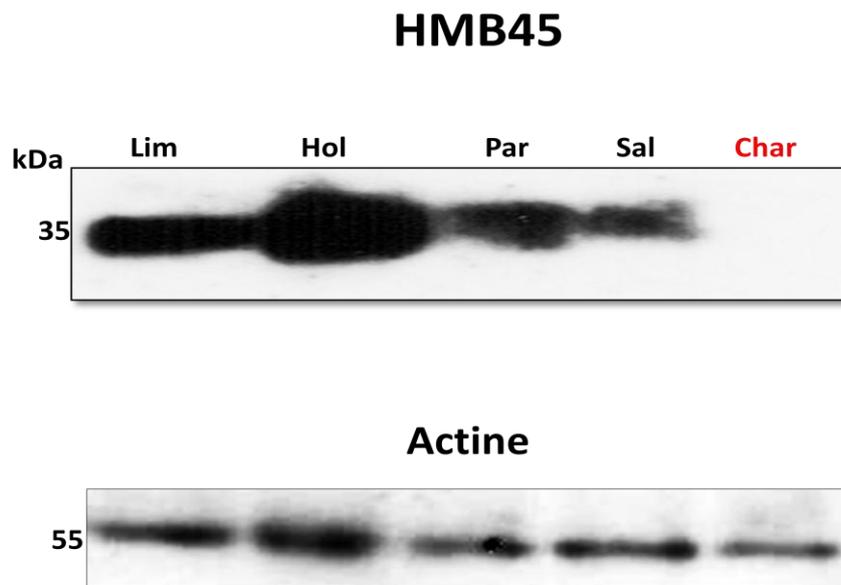
**Figure 42 :** Profil de détection western blotting avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines de races Charolaise (**Char**), Holstein (**Hol**) et Limousine (**Lim**) comparé à celui d'extraits protéiques de mélanocytes murins. L'analyse comparée des différents profils permet d'identifier les bandes qui correspondent aux formes mPmel17 ( $\approx$  115 kDa), iPmel17 ( $\approx$  95 kDa) et P70 ( $\approx$  70 kDa) ainsi que les bandes correspondant à des marquages aspécifiques. Le western blotting avec l'anticorps anti actine sert de contrôle de la quantité de protéines chargées pour chacun des échantillons. Les temps indiqués sous les profils western blotting correspondent à la durée d'exposition de la membrane de nitrocellulose avec le film autoradiographique.

## 2. Analyses en western blotting avec l'anticorps $\alpha$ PEP13h

Les analyses western blotting utilisant l'anticorps  $\alpha$ PEP13h sont réalisées sur des extraits protéiques de peaux bovines de races Charolaise, Limousine et Prim'Holstein (Figure 42). Ces analyses montrent des différences avec celles utilisant l'anticorps  $\alpha$ PEP13. L'intensité des bandes détectées ainsi que leurs nombres sont plus importants, de plus, le profil de détection est différent entre les échantillons protéiques sauvages comparés entre eux et comparés à l'extrait protéique Charolais. Au bout d'une minute d'exposition, les bandes à  $\approx 90$  kDa et celle à  $\approx 95$  kDa correspondant à iPmel17 sont détectées au sein des extraits protéiques sauvages et plus faiblement au sein de l'extrait Charolais. Ces bandes sont identiques à celle détectée avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13 à partir de dix minutes d'exposition. Une bande à  $\approx 115$  kDa correspondant à mPmel17, minoritaire par rapport à celle à  $\approx 95$  kDa est détectée de manière progressive au sein des extraits protéiques sauvages et Charolais. La forme native de Pmel17 (P70) à  $\approx 70$  kDa spécifique du RE est détectée au bout d'une minute d'exposition au sein des extraits protéiques sauvages Limousin et Holstein. Cette bande est détectée avec une très faible intensité de signal et au bout de dix minutes d'exposition au sein de l'extrait protéique Charolais. Une bande à  $\approx 28$  kDa pouvant correspondre au fragment M $\beta$  est détectée au sein des extraits protéiques Holstein et Charolais. D'autres bandes correspondant à du marquage aspécifique sont essentiellement détectées au sein des extraits protéiques sauvages Limousin ( $\approx 60$  et  $\approx 80$  kDa) et Prim'Holstein ( $\approx 40$ ,  $\approx 55$ ,  $\approx 60$ ,  $\approx 75$  et  $\approx 80$  kDa). Afin de vérifier la spécificité de détection de l'anticorps  $\alpha$ PEP13h, le profil western blotting obtenu à partir des extraits protéiques de peaux est comparé au profil western blotting obtenu avec le même anticorps sur des extraits protéiques de mélanocytes murins (cellules Melan-a). Le profil de détection est similaire pour les bandes correspondantes au poids moléculaire de mPmel17 ( $\approx 115$  kDa), iPmel17 ( $\approx 95$  kDa), P70 ( $\approx 70$  kDa) mais aussi pour celle à  $\approx 90$  kDa présente dans tous les échantillons protéiques de peaux et celle à  $80$  kDa présente uniquement au sein des échantillons protéiques sauvages.

### 3. Analyses en western blotting avec l'anticorps HMB45

Les analyses en western blotting utilisant l'anticorps HMB45 sont réalisées sur des extraits protéiques de peaux de bovins de races Charolaise, Limousine, Salers, Prim'Holstein et Parthenaise (Figure 43). Ces analyses montrent un profil de bande uniquement au sein des échantillons protéiques contrôle provenant des animaux porteurs de l'allèle *PMEL17* sauvage. Une seule bande est détectée pour chacun de ces échantillons et cette bande correspond au domaine RPT de Pmel17, responsable de la formation des fibrilles du mélanosome de stade II ( $\approx 35$  kDa). L'absence de détection de cette bande au sein de l'extrait protéique Charolais traduit une absence d'évolution de la protéine mutée vers cette forme et donc une absence de mélanosomes de stade II au sein des mélanocytes Charolais.



**Figure 43 : Profil de détection western blotting avec l'anticorps HMB45 sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines** de races Charolaise (**Char**), Holstein (Hol), Limousine (Lim), Parthenaise (Par) et Salers (Sal). Seules les bandes qui correspondent aux fibrilles matures du mélanosome de stades II ( $\approx 35$  kDa) sont détectées et uniquement au sein des extraits protéiques des races bovines portant l'allèle sauvage du gène *PMEL17*. Le western blotting avec l'anticorps anti actine sert de contrôle à la quantité de protéines chargées pour chacun des échantillons.

#### 4. Discussion relative à la détection de Pmel17 par western blotting avec les anticorps $\alpha$ PEP13, $\alpha$ PEP13h et HMB45 au sein d'extraits protéiques de peaux

Afin de vérifier l'hypothèse de la rétention du variant Pmel17 au niveau de RE, nous avons identifié les formes protéiques présentes dans les échantillons de peaux Charolaise avec les anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h spécifiques des formes précoces de Pmel17 et l'anticorps HMB45 spécifique des formes matures de celle-ci. Ces anticorps, à travers notamment des études de cartographie d'épitopes ont largement contribué à la définition de la voie de biosynthèse de Pmel17 et ont permis l'identification et la détermination du niveau de maturation de ses différentes formes protéiques.

Nos résultats montrent que les deux anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h sont susceptibles de détecter les protéines Pmel17 bovines avec une sensibilité plus importante lorsqu'il s'agit de l'anticorps  $\alpha$ PEP13h. Ces résultats, du fait de la détection des formes iPmel17 et mPmel17 au sein des extraits protéiques Charolais contredisent l'hypothèse d'une rétention totale du variant Pmel17 dans le RE. En effet, il est bien établi que l'épitope de l'anticorps  $\alpha$ PEP13h est situé dans la région C-terminale de Pmel17 (Watabe et al. 2004; Harper et al. 2008) et qu'il reconnaît la protéine sous trois formes : 1) la forme majoritaire iPmel17/P1/P100 partiellement glycosylée sensible à la digestion par l'endoH spécifique du compartiment Golgien ; 2) la forme minoritaire mPmel17/P2/P120 qui correspond à une petite fraction d'iPmel17 complètement glycosylée, résistante à l'endoH et spécifique du compartiment endosomal (pré-mélanosome) ; 3) la forme M $\beta$ /P26 qui correspond au fragment cytoplasmique issue du clivage de la forme mPmel17 au niveau du pré-mélanosome (Berson et al. 2001; Yasumoto et al. 2004).

La bande à  $\approx 70$  kDa que nous appelons P70 correspond à la forme native de Pmel17 très partiellement maturée, spécifique du RE. Il est rarement fait mention de la détection de formes natives de Pmel17 avec les anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h. Cependant, nos analyses western blotting réalisées avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h sur des extraits protéiques de mélanocytes murins (cellules Melan-a) détectent une bande de poids moléculaire ( $\approx 72$  kDa) relativement équivalente à celle de P70. De plus, la détection de la forme native de Pmel17 ( $\approx 75$  kDa) avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h a déjà été constatée au sein d'extraits protéiques de mélanocytes humains sains (Hoashi et al. 2005) et de cellules de mélanomes humains (cellules MNT-1) (Yasumoto et al. 2004; Hoashi et al. 2005). La faible détection de la forme

P70 avec cet anticorps au sein des extraits protéiques Charolais comparée aux extraits protéiques sauvages nous laisse supposer une prise en charge partielle de la protéine Charolaise néo-synthétisée par le système de contrôle qualité du RE qui l'enverrait vers la voie de dégradation. Cette supposition est corroborée par la faible détection des formes iPmel17 et mPmel17 par l'anticorps  $\alpha$ PEP13h au sein du même échantillon comparé aux échantillons protéiques sauvages. Ces résultats démontrent que même s'il y a une rétention du variant Pmel17 dans le RE, celle-ci ne serait que partielle, une fraction de Pmel17 parviendrait à s'échapper du RE et serait adressée au Golgi (iPmel17) voir jusqu'au pré-mélanosome (mPmel17).

Nos analyses utilisant l'anticorps HMB45 détectent spécifiquement les fibrilles du mélanosome de stade II et uniquement au sein des échantillons contrôle, provenant des animaux exprimant l'allèle sauvage de *PMEL17*. En effet, l'anticorps HMB45 est un marqueur du mélanosome de stade II qui interagit spécifiquement avec la matrice fibrillaire (Berson et al. 2001; Kushimoto et al. 2001; Raposo et al. 2001). Son épitope est localisé dans la région luminale de Pmel17 au sein du domaine RPT qui correspond à 10 répétitions imparfaites de 13 résidus prolines, sérines et thréonines (Kwon et al. 1991; Solano et al. 2000; Nichols et al. 2003). Il reconnaît spécifiquement la forme « sialylée » du fragment RPT soluble, responsable de la formation des fibrilles du mélanosome de stade II ( $\approx$  35 kDa) et dans une moindre mesure lorsque ce fragment est associé aux autres domaines de la région luminale de Pmel17 (fragment M $\alpha$  ( $\approx$  85 kDa) dans le pré-mélanosome (Hoashi et al. 2006; Valencia et al. 2007; Harper et al. 2008).

L'absence de détection de ces fibrilles au sein de l'échantillon Charolais démontre le défaut d'adressage de la protéine Pmel17 Charolaise aux mélanosomes de stade II et confirme ainsi l'abrogation de la biogenèse du mélanosome chez les individus Charolais. Ces analyses sont en accord avec les travaux de Renieri montrant par microscopie électronique l'absence de mélanosomes matures sur des coupes de bovins Charolais (Renieri et al. 1993).

#### **IV. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTEINE PMEL17 CHAROLAISE**

Les tests de localisation subcellulaire ont pour but de valider et de compléter les données relatives à l'adressage de la protéine Pmel17 Charolaise obtenues en western blotting. Ces tests correspondent à des triples marquages immunofluorescents, dont l'analyse par microscopie confocale, permet de définir le trafic de la protéine Pmel17 Charolaise au sein de la voie de sécrétion. Ces tests sont réalisés sur des coupes de peaux de bovins de races Charolaise et Prim'Holstein. Elles consistent en des sections transversales qui permettent de conserver l'organisation structurale de la peau de la superficie vers la profondeur. Les anticorps  $\alpha$ PEP13h, GP100 et HMB45 sont utilisés pour la détection de la protéine Pmel17 à différents niveaux de la voie de sécrétion. L'anticorps  $\alpha$ PEP13h (produit chez le lapin) et son analogue GP100 (produit chez la chèvre) sont utilisés pour la détection de Pmel17 dans les stades précoces de la voie de sécrétion tandis que l'anticorps HMB45 est utilisé pour la détection de la protéine fonctionnelle au sein du mélanosome de stade II. Les marqueurs des différents organites cellulaires utilisés au cours de ces tests sont répartis en 2 catégories : les partenaires de Pmel17 au sein du mélanosome et les marqueurs des compartiments précoces de la biosynthèse de Pmel17. Les associations d'anticorps utilisés pour la localisation subcellulaire de Pmel17 sont présentées dans le Tableau 7.

Les analyses des données de localisation subcellulaire sont précédées de la description des marqueurs des différents organites cellulaires utilisés au cours de ces tests, de l'analyse des données de détection des partenaires mélanosomiques de Pmel17 à partir d'extraits protéiques tissulaires ainsi que la description des paramètres d'acquisition des données de localisation subcellulaire.

## 1. Marqueurs spécifiques des organites de la voie de sécrétion de Pmel17

### a. Partenaires de Pmel17 au sein du mélanosome

Les anticorps  $\alpha$ PEP7h, anti Tyrp1 et  $\alpha$ PEP8h dirigés respectivement contre les enzymes Tyr, Tyrp1/Trp1, Tyrp2/Trp2/DCT (enzymes de la famille tyrosinase) sont utilisés comme marqueurs des différents stades de la biogenèse du mélanosome. Ces enzymes sont responsables de la synthèse de mélanine qui intervient au stade II de la biogenèse du mélanosome. La protéine Tyr est l'enzyme clé de cette synthèse tandis que Tyrp1 et Tyrp2 régulent la quantité et la qualité de l'eumélanine produite durant la mélanogenèse. Elles acquièrent leur activité catalytique lorsqu'elles sont délivrées aux mélanosomes de stade II. Ces trois enzymes sont essentiellement détectables au sein des mélanosomes, cependant elles possèdent des niveaux d'expression variables selon le stade de la biogenèse du mélanosome. La tyrosinase Tyr est détectée principalement dans le mélanosome de stade II et dans une moindre mesure dans les mélanosomes de stade III et IV, Tyrp2 présente un niveau de détection similaire à tous les stades de la biogenèse du mélanosome (Kushimoto et al. 2001). Tyrp1 est majoritairement détectée au sein des mélanosomes de stades III et IV et minoritairement au sein du mélanosome de stade II (Raposo et al. 2001).

### b. Marqueurs des compartiments précoces de la biosynthèse de Pmel17

Les anticorps dirigés contre la calréticuline, les protéines 58K, EEA1 et LAMP1 sont utilisés respectivement comme marqueurs spécifiques du RE, du Golgi, de l'endosome précoce et du lysosome.

- **La calréticuline** est une lectine chaperonne soluble qui assure le repliement des protéines par l'ajout de résidus N-glycanes, elle est exclusive du RE et couramment utilisée comme marqueur de ce compartiment.

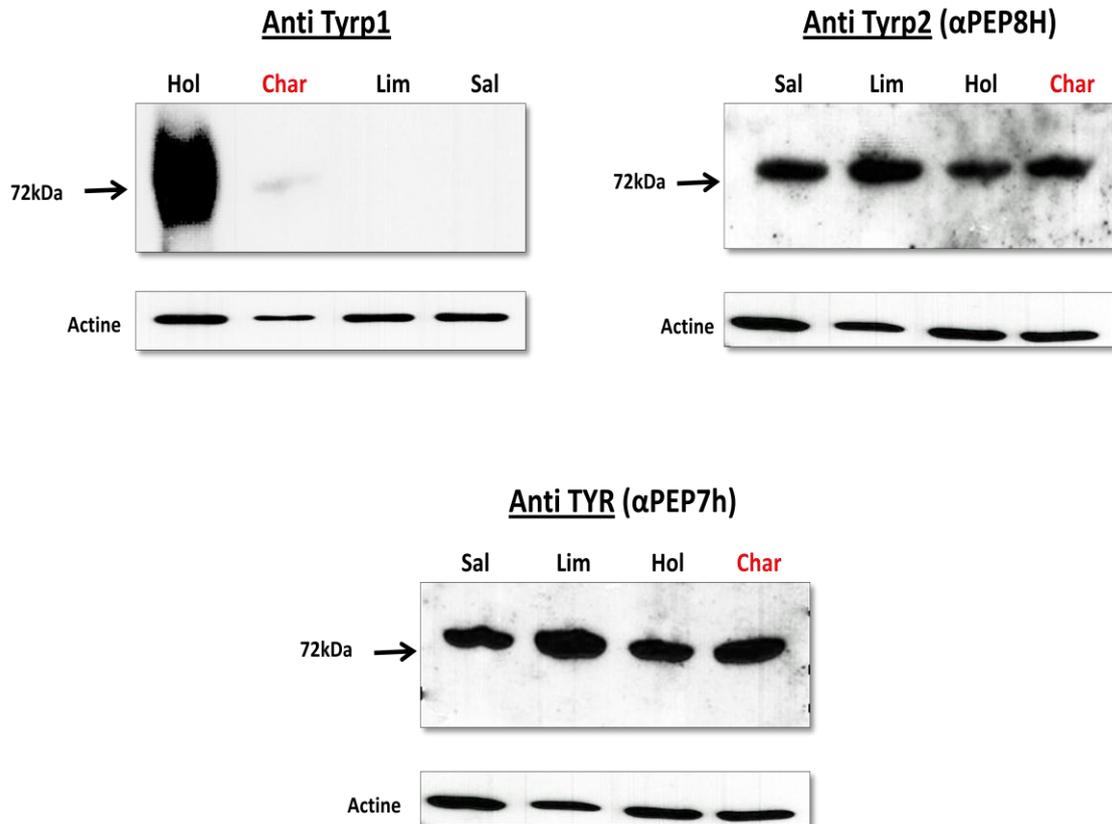
- **La protéine 58K** ou formiminotransférase cyclodéaminase est une enzyme qui catalyse la conversion du formiminoglutamate et du tétrahydrofolate en formiminotetrahydrofolate et en glutamate. Elle est localisée dans les microtubules de la membrane périphérique du Golgi.

- **La protéine EEA1** (Early Endosome Antigen 1 protein ) est une protéine spécifique des endosomes précoces, sa liaison aux vésicules de phospholipides contenant la phosphatidylinositol 3-phosphate est nécessaire au trafic des endosomes.

- **La protéine LAMP1** (Lysosome-Associated Membran protein 1) est une glycoprotéine de la membrane des lysosomes également présente au sein des membranes délimitant le mélanosome (Orlow et al. 1993; Luo et al. 1994). La protéine LAMP1 interagit avec certains ligands carbohydrates pour donner des sélectines (lectines à un seul domaine transmembranaire).

Compartiments	RE	Golgi	Endosome	Lysosome	Mélanosome
Marqueurs	Anti-calréticuline (Poulet)	Anti-58K (Souris)	Anti EEA1 (Lapin)	Anti- LAMP1 (Lapin)	Tyr - $\alpha$ PEP7h(lapin): II, III, IV Tyrp1(lapin): III, IV Tyrp2 - $\alpha$ PEP8h(lapin):I,II,III,IV

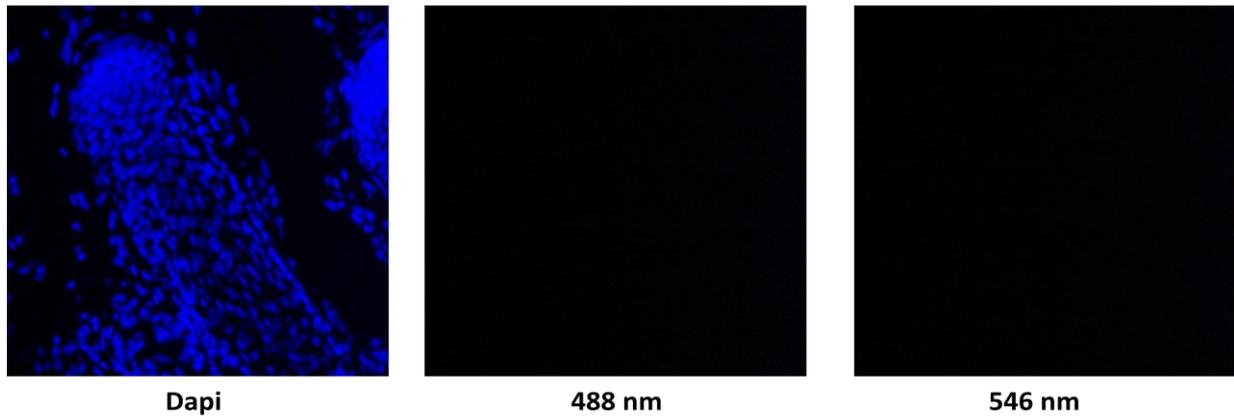
**Tableau 7 : Association des anticorps utilisés pour la localisation de Pmel17** au sein des différents organites de la voie de sécrétion. Les anticorps utilisés pour chaque double marquage proviennent d'espèces différentes afin d'éviter les interactions non spécifiques.



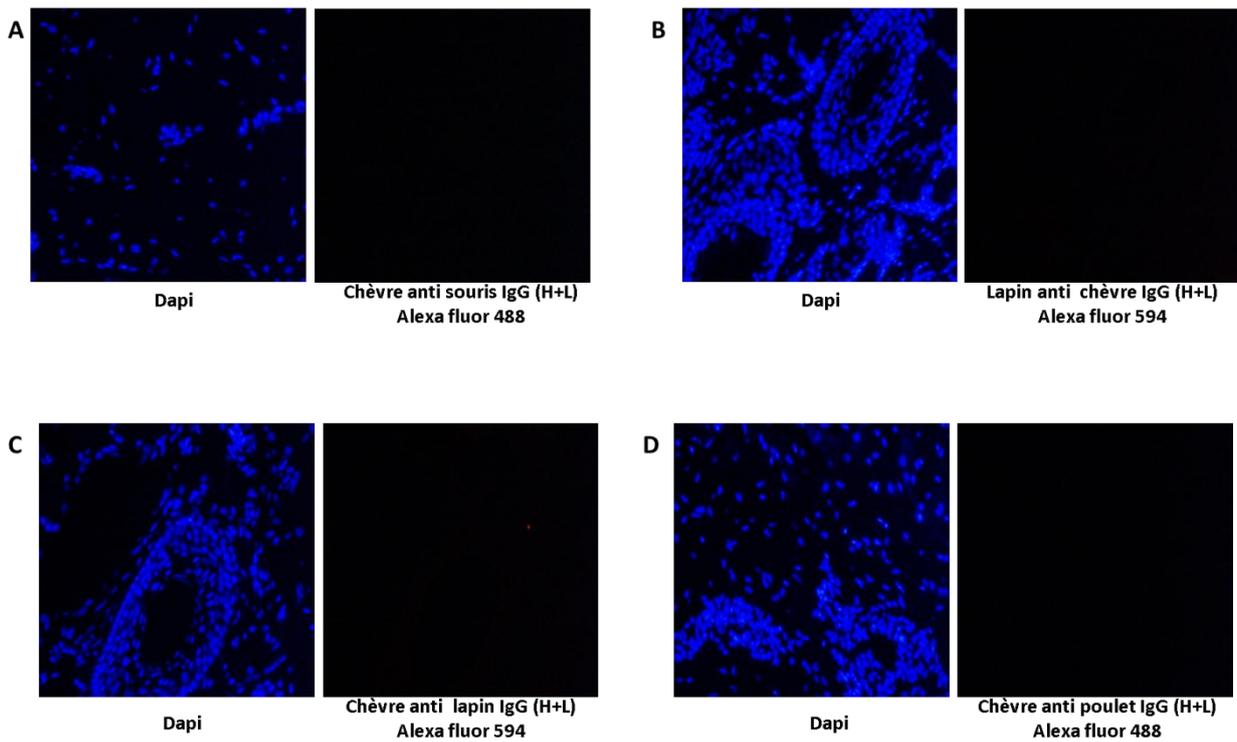
**Figure 44 : Profil de détection western blotting avec les anticorps anti Tyrp1, αPEP8h et αPEP7h sur des extraits protéiques totaux de peaux bovines de races Charolaise (Char), Holstein (Hol), Limousine (Lim), et Salers (Sal). Tyr et Tyrp2 sont détectées au sein de tous les échantillons protéiques, Tyrp1 est détectée au sein de l'échantillon Holstein et plus faiblement au sein de l'échantillon Charolais. Le western blotting avec l'anticorps anti actine sert de contrôle à la quantité de protéines chargées pour chacun des échantillons.**

## **2. Détection des enzymes de la famille des tyrosinases à partir d'extraits protéiques tissulaires**

La spécificité des anticorps dirigés contre les enzymes de la famille des tyrosinases a été évaluée par des analyses western blotting réalisées sur des extraits protéiques totaux issus de peaux de différentes races bovines (Charolaise, Holstein, Salers et Limousine) (Figure 44). Les protéines Tyr et Tyrp2 sont détectées de façon similaire au sein de tous les échantillons protéiques, y compris l'échantillon Charolais. La protéine Tyrp1 n'est détectée qu'au sein des extraits protéiques Prim'Holstein et très faiblement au sein de l'extrait protéique Charolais, après une exposition prolongée de la membrane de nitrocellulose avec le film autoradiographique. Ce résultat est concordant avec les travaux de Guibert réalisés au sein de notre équipe (Guibert et al. 2004), montrant une absence de transcrit TYRP1 chez les bovins de races Limousine et Salers ainsi qu'une sous-expression de ces transcrits chez le Charolais.



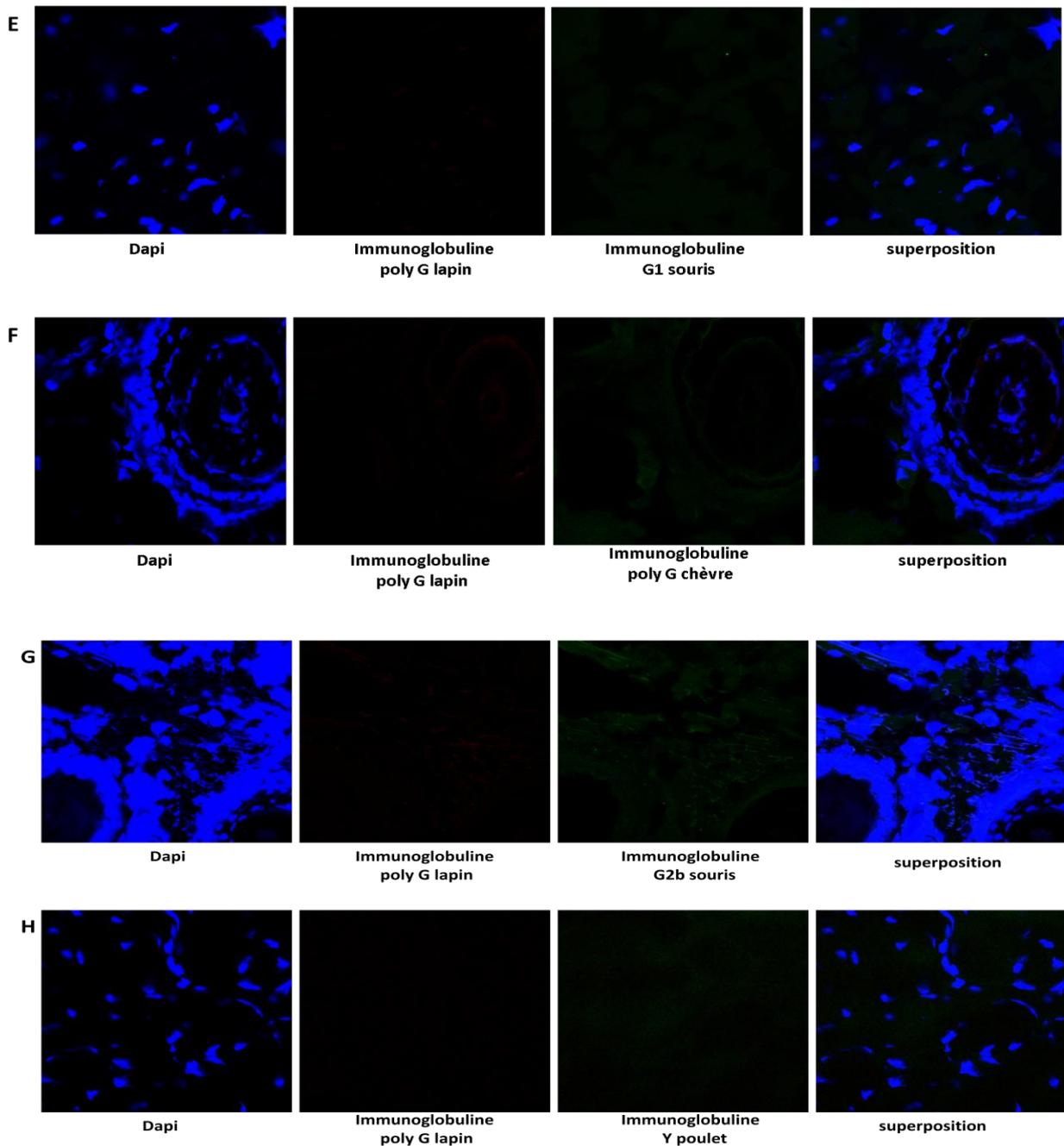
**Figure 45 : Contrôle de la fluorescence intrinsèque aux échantillons de peaux bovines.** Exposition des coupes de peaux aux longueurs d'ondes d'émission des fluorescences verte et rouge respectivement 488 nm et 546 nm. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI).



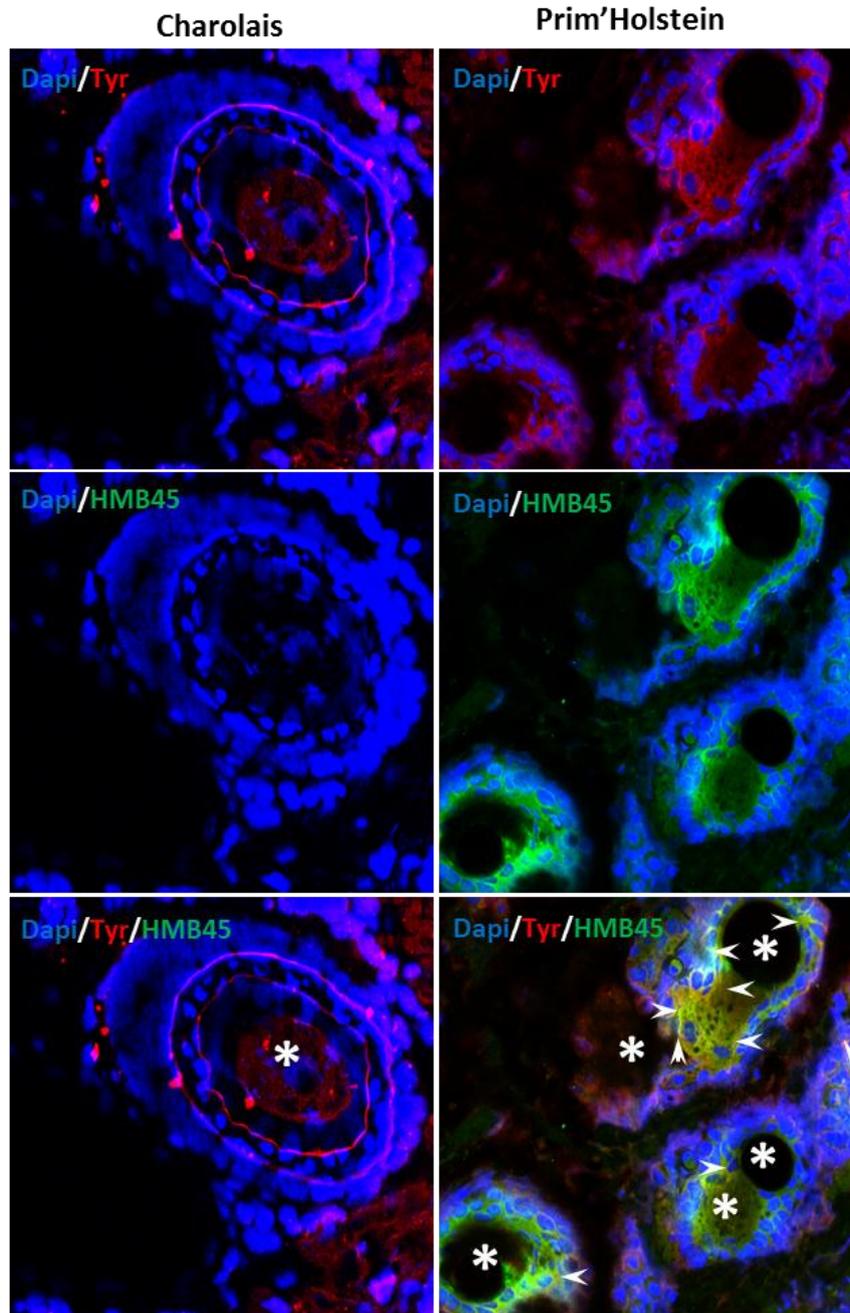
**Figure 46 : Contrôle des signaux de fluorescence imputables à des interactions non spécifiques des anticorps secondaires.** Marquage des coupes avec les anticorps secondaires couplés aux Alexa 488 et 596. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI). **A)** Anticorps secondaire chèvre anti souris dirigé contre les anticorps HMB45 et 58K, **B)** Anticorps secondaire lapin anti chèvre dirigé contre l'anticorps GP100, **C)** Anticorps secondaire chèvre anti lapin dirigé contre les anticorps anti Tyrp1,  $\alpha$ PEP7h,  $\alpha$ PEP8h et  $\alpha$ PEP13h, **D)** Anticorps secondaire chèvre anti poulet dirigé l'anticorps anti calréticuline.

### **3. Paramètres d'acquisition des données de localisation subcellulaire**

L'acquisition des données relatives à la localisation subcellulaire de la protéine Pmel17 est réalisée par microscopie confocale. Pour chacune des expériences, trois types de contrôle sont réalisés. Le premier contrôle est réalisé sur les coupes en absence de marquage afin d'évaluer la fluorescence intrinsèque de l'échantillon de peau (Figure 45). Le deuxième contrôle consiste à réaliser des marquages avec l'anticorps secondaire seul, afin d'évaluer l'intensité de fluorescence pouvant être liée à des interactions non spécifiques de celui-ci (Figure 46). Le troisième contrôle consiste à réaliser des marquages avec des sérums contenant des immunoglobulines de même espèce et de même isotype que les anticorps primaires d'intérêts, afin d'évaluer la valeur d'intensité de fluorescence qui serait liée à du signal aspécifique (Figure 47). La somme de ces trois valeurs constitue le seuil d'intensité de fluorescence au-delà duquel un signal est considéré comme spécifique.



**Figure 47 : Contrôle des signaux de fluorescence imputables à des interactions isotypiques.** Double marquage avec les immunoglobulines de même isotype que les anticorps primaires d'intérêts. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI). Les couleurs vert et rouge correspondent respectivement au fluorochrome Alexa 488 et 546. **E)** Marquage avec les immunoglobulines **G1 souris** / **poly G lapin** utilisées comme contrôle des doubles marquages **HMB45 / Tyrp1**, **HMB45 /  $\alpha$ PEP7h**, **HMB45 /  $\alpha$ PEP8h**, **58K /  $\alpha$ PEP13h**, **F)** Marquage avec les immunoglobulines **poly G chèvre** / **poly G lapin** utilisées comme contrôle du double marquage **GP100 /  $\alpha$ PEP7h**, **GP100 /  $\alpha$ PEP8h**, **G)** Marquage avec les immunoglobulines **G2b souris** / **poly G lapin** utilisées comme contrôle du double marquage **58k /  $\alpha$ PEP13h**, **H)** Marquage avec les immunoglobulines **IgY** / **poly G lapin** utilisées comme contrôle du double marquage **calréticuline /  $\alpha$ PEP13h**.



**Figure 48 : Localisation des fibrilles Pmel17 avec la protéine Tyr par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps HMB45 (dilution 1/10) reconnaissant les fibrilles Pmel17 est détecté par la fluorescence verte, l'anticorps  $\alpha$ PEP7h (dilution 1/10) reconnaissant la protéine Tyr est détecté par la fluorescence rouge. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.

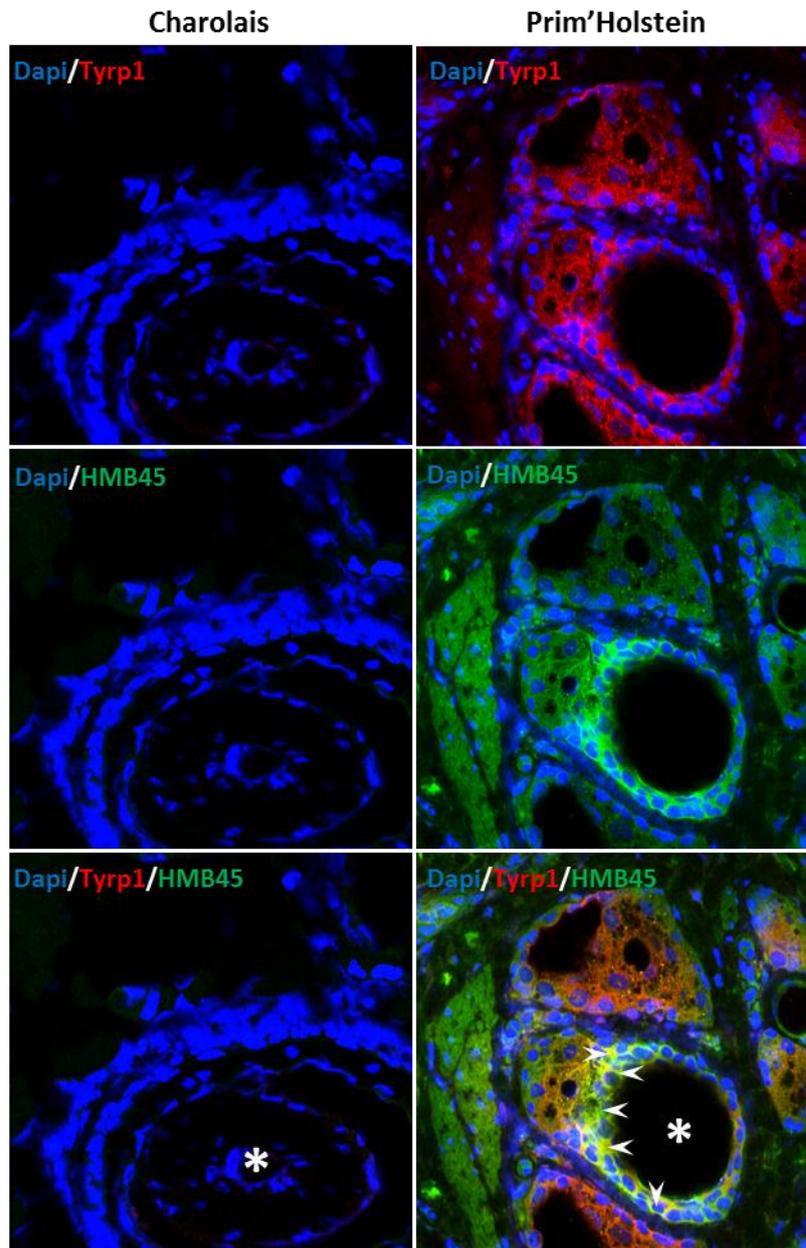
#### 4. Analyse des données de localisation subcellulaire

##### a. Localisation des fibrilles matures Pmel17 avec les enzymes de la famille des tyrosinases

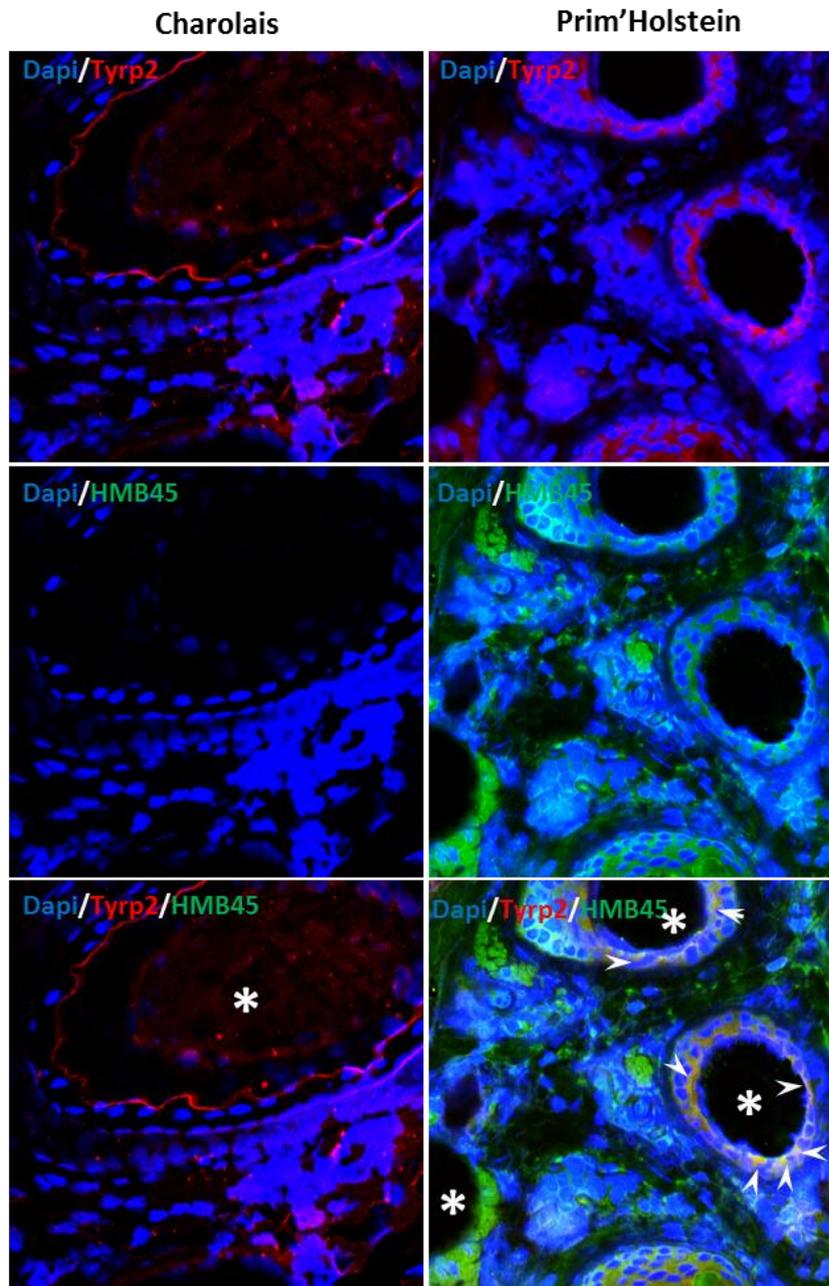
Les résultats du marquage individuel des enzymes Tyr, Tyrp1 et Tyrp2 obtenus par immunofluorescence sont similaires à ceux des analyses de détection de ces trois enzymes par western blotting. En effet, les protéines Tyr et Tyrp2 révèlent un marquage positif aussi bien sur les coupes de peaux Charolaise que Prim'Holstein, alors que Tyrp1 est détectée uniquement sur les coupes de peaux Prim'Holstein. Ainsi, l'absence de détection de la protéine Tyrp1 sur les coupes de peaux Charolaise, confirme la sous-expression constatée pour cette dernière, au sein du profil western blotting des échantillons Charolais.

Les analyses des résultats de marquage avec l'anticorps HMB45 couplé à l'Alexa fluor 488 (vert) et les anticorps spécifiques des enzymes Tyr (Figure 48), Tyrp1 (Figure 49) et Tyrp2 (Figure 50) couplés à l'Alexa fluor 596 (rouge) montrent une co-localisation uniquement de la protéine Pmel17 sauvage avec ces trois enzymes. Cette co-localisation correspond à la fluorescence jaune observée dans les espaces séparant les noyaux des cellules, marqués au DAPI (bleu). Sur les coupes de peaux sauvages, les profils de co-localisation de Pmel17 avec les protéines Tyr, Tyrp1 et Tyrp2 sont similaires. Toutefois, le signal de co-localisation de la protéine Pmel17 sauvage avec la protéine Tyrp2 est plus faible comparé à ceux des deux autres protéines. La fluorescence jaune caractéristique de cette co-localisation est observée majoritairement au niveau des mélanocytes folliculaires, celle-ci s'étend du noyau d'une cellule jusqu'aux noyaux des cellules avoisinantes, caractéristique de la localisation cytoplasmique des mélanosomes.

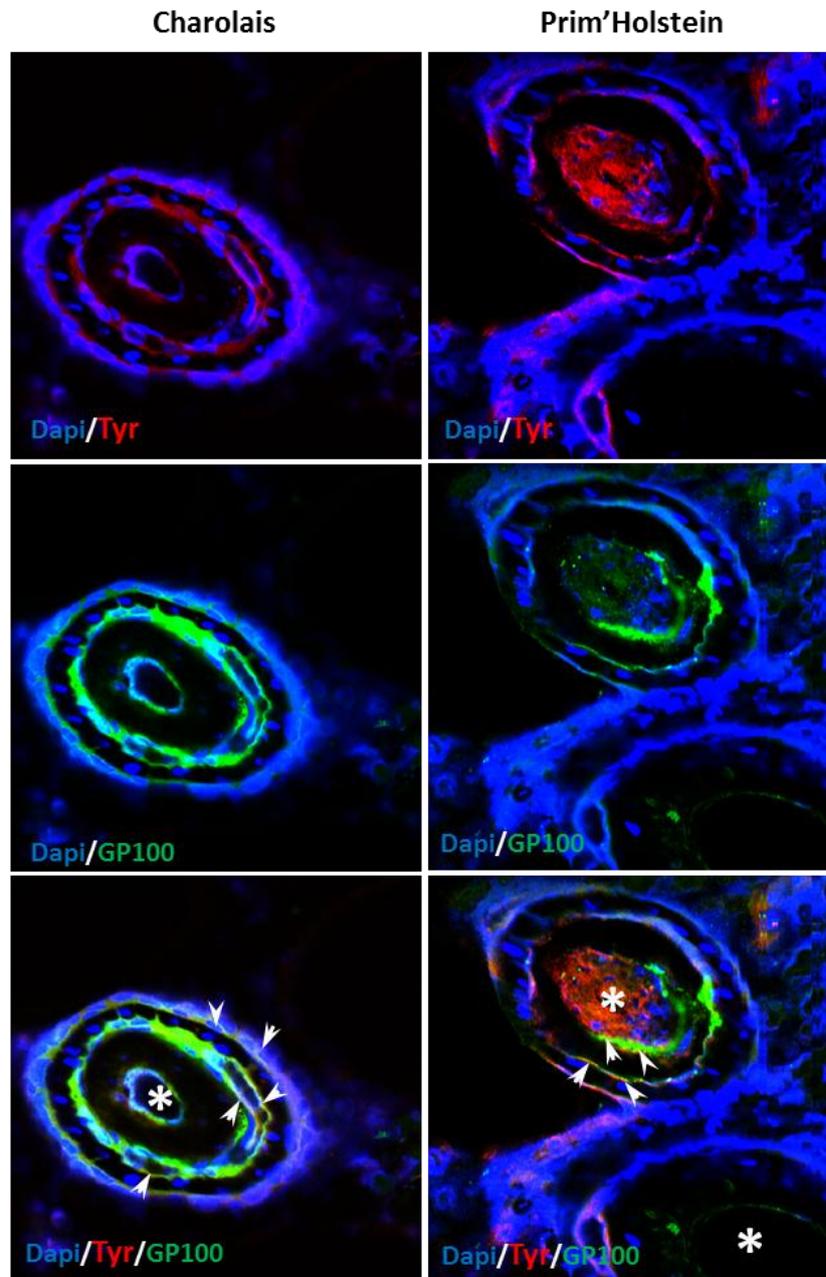
L'analyse des coupes de peaux Charolaise montre une absence de marquage de la protéine Pmel17 avec l'anticorps HMB45. Ce résultat est concordant avec les analyses western blotting indiquant l'absence de fibrilles Pmel17 spécifiques du mélanosome de stade II au sein des échantillons protéiques de peaux Charolaise.



**Figure 49 : Localisation des fibrilles Pmel17 avec la protéine Tyrp1 par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps HMB45 (dilution 1/10) reconnaissant les fibrilles Pmel17 est détecté par la fluorescence verte, l'anticorps anti-Tyrp1 (dilution 1/50) reconnaissant la protéine Tyrp1 est détecté par la fluorescence rouge. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.



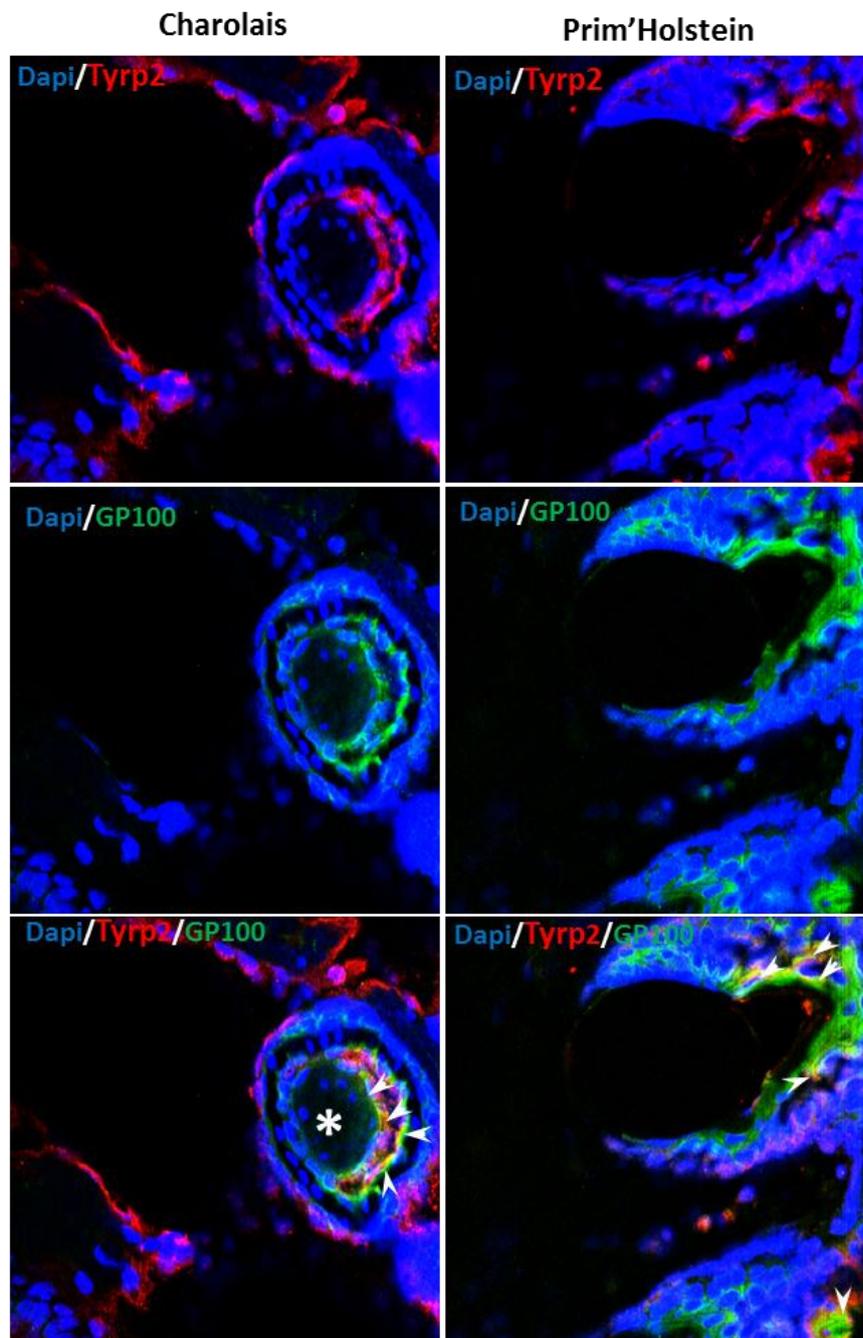
**Figure 50 : Localisation des fibrilles Pmel17 avec la protéine Tyrp2 par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps HMB45 (dilution 1/10) reconnaissant les fibrilles Pmel17 est détecté par la fluorescence verte, l'anticorps  $\alpha$ PEP8h (dilution 1/10) reconnaissant la protéine Tyrp2 est détecté par la fluorescence rouge. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.



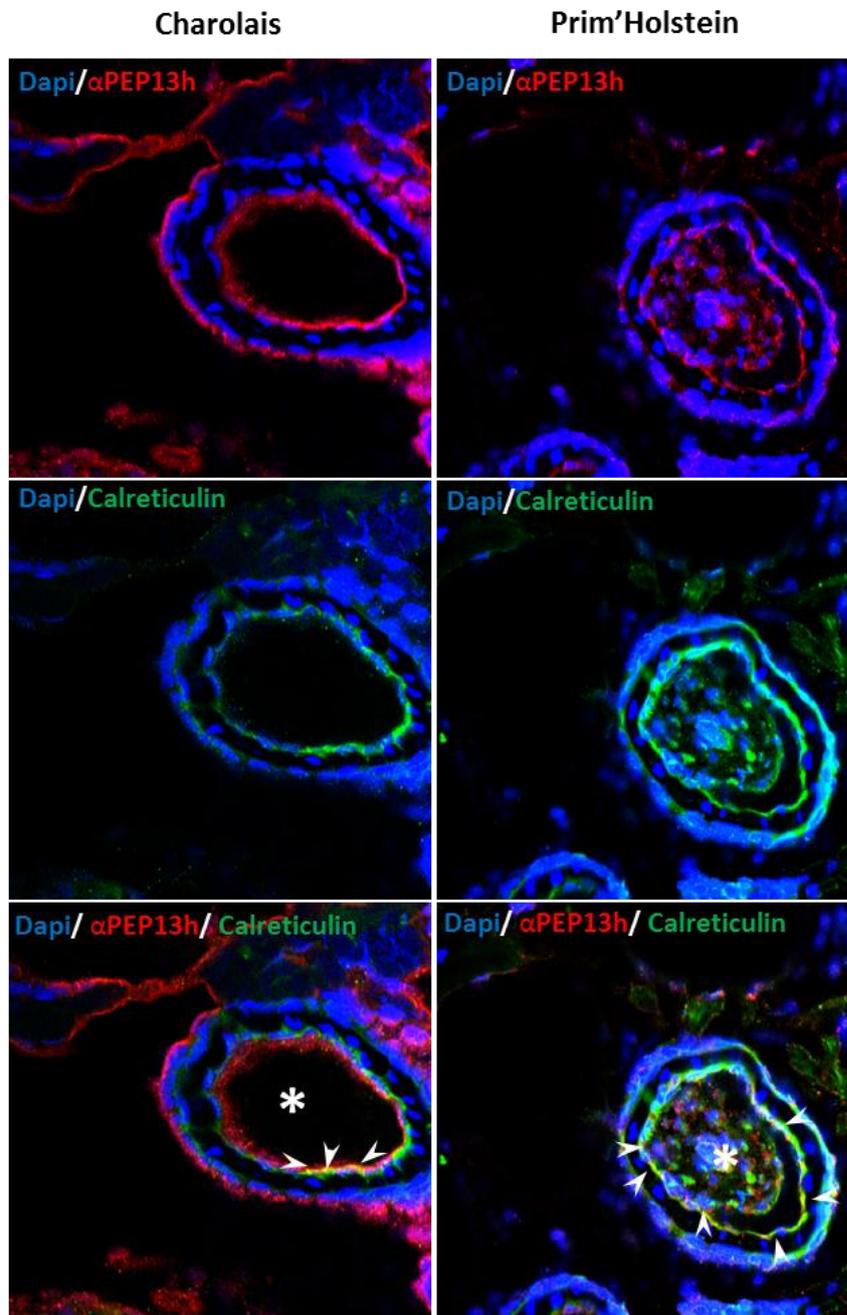
**Figure 51 : Localisation des formes précoces de Pmel17 avec la protéine Tyr par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps GP100 (dilution 1/20) reconnaissant Pmel17 est détecté par la fluorescence verte, l'anticorps  $\alpha$ PEP7h (dilution 1/10) reconnaissant la protéine Tyr est détecté par la fluorescence rouge. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.

**b. Localisation des formes précoces de Pmel17 avec les enzymes Tyr et Tyrp2**

Les analyses des résultats de marquage avec l'anticorps GP100 couplé à l'Alexa fluor 488 (vert) et les anticorps spécifiques des enzymes Tyr (Figure 51) et Tyrp2 (Figure 52) couplés à l'Alexa fluor 596 (rouge) montrent une très faible co-localisation des protéines sauvages et mutantes avec les protéines Tyr et Tyrp2. Le signal de co-localisation est observé au niveau des mélanocytes folliculaires et se restreint à la périphérie d'un nombre peu élevé de noyaux. Le profil de co-localisation périnucléaire des protéines Tyr et Tyrp2 avec la protéine Pmel17 est spécifique des compartiments précoces de la voie de biosynthèse de ces protéines.



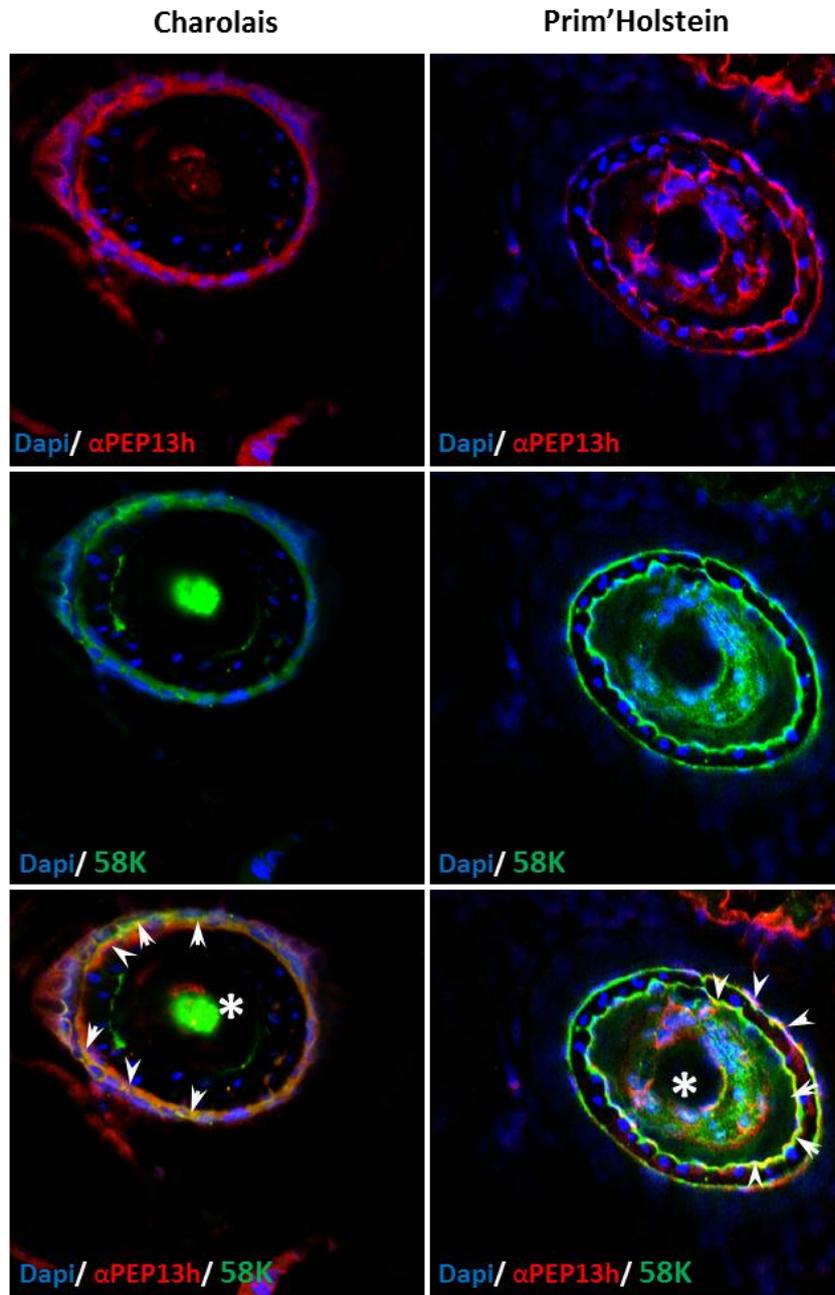
**Figure 52 : Localisation des formes précoces de Pmel17 avec la protéine Tyrp2 par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps GP100 (dilution 1/20) reconnaissant Pmel17 est détecté par la fluorescence verte, l'anticorps  $\alpha$ PEP8h (dilution 1/10) reconnaissant la protéine Tyrp2 est détecté par la fluorescence rouge. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.



**Figure 53 : Localisation de la protéine Pmel17 dans le RE par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps  $\alpha$ PEP13h (dilution 1/10) reconnaissant Pmel17 est détecté par la fluorescence rouge, l'anticorps anti calréticuline, marqueur du RE (dilution 1/50) est détecté par la fluorescence verte. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.

**c. Localisation de Pmel17 dans le RE**

Les analyses des résultats de marquage avec les anticorps  $\alpha$ PEP13h couplés à l'Alexa fluor 596 (rouge) et la calréticuline couplé à l'Alexa fluor 488 (vert) montrent une faible co-localisation des protéines Pmel17 sauvage et charolaise avec la calréticuline (Figure 53). La fluorescence jaune caractéristique de cette co-localisation est observée autour des noyaux des mélanocytes folliculaires. Ce marquage périnucléaire est spécifique de la localisation de Pmel17 dans le RE.



**Figure 54 : Localisation de la protéine Pmel17 dans le Golgi par microscopie confocale.** Le profil de réactivité des anticorps est examiné par un triple marquage. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu (DAPI), l'anticorps  $\alpha$ PEP13h (dilution 1/10) reconnaissant Pmel17 est détecté par la fluorescence rouge, l'anticorps anti 58K, marqueur du Golgi (dilution 1/50) est détecté par la fluorescence verte. La fluorescence jaune spécifique de la co-localisation des deux signaux est indiquée par des flèches. Les astérisques (\*) indiquent les emplacements des follicules pileux.

#### **d. Localisation de Pmel17 dans le Golgi**

Les analyses des résultats de marquage avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h couplé à l'Alexa fluor 596 (rouge) et l'anticorps 58K couplé à l'Alexa fluor 488 (vert) montrent une localisation des protéines Pmel17 sauvage et charolaise dans le Golgi (Figure 54). Le profil de co-localisation est similaire à celui du RE avec une faible fluorescence jaune détectée dans la région périnucléaire au sein des mélanocytes folliculaires. Les résultats de localisation du variant Pmel17 dans le RE et le Golgi concordent avec les analyses western blotting réalisées avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h indiquant la présence des formes iPmel17 et mPmel17 au sein des échantillons protéiques de peaux Charolais.

#### **e. Localisation de Pmel17 dans l'endosome précoce et le lysosome**

Malgré l'utilisation d'anticorps provenant de différentes espèces, les marqueurs des endosomes EEA1 et des lysosomes LAMP1 révèlent un marquage aspécifique sur les coupes de peaux bovines. Ces anticorps marquent les coupes de peaux sur toutes leurs surfaces avec l'apparition de points fluorescents présents de manière anarchique. La difficulté de travailler sur du matériel bovin réside dans le fait qu'il existe très peu d'anticorps sur le marché qui ciblent des protéines de cette espèce. Malgré des homologies de séquence inter-espèce, il est très compliqué d'appréhender la fonctionnalité d'anticorps dédiés à d'autres espèces sur le bovin.

## 5. Discussion relative à la localisation subcellulaire de la protéine Pmel17 Charolaise

Les analyses western blotting réalisées sur les extraits protéiques de peaux avec l'anticorps HMB45 ont montré une absence de détection de la protéine Charolaise sous sa forme fonctionnelle responsable de la formation de la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II. Les tests de localisation subcellulaire par microscopie confocale visent à confirmer le défaut d'adressage de la protéine Charolaise et à apporter des précisions sur son compartiment d'adressage.

Le pré-mélanosome est l'unique compartiment de la biogenèse du mélanosome à appartenir à la voie endosomale (Raposo et al. 2001), c'est à ce niveau que Pmel17 sous sa forme soluble joue un rôle primordial en assurant le changement de conformation de ce compartiment et sa transition vers le mélanosome de stade II. C'est seulement après la transition en mélanosome de stade II que les enzymes de la mélanogenèse deviennent actives et que la synthèse de mélanine a lieu (Kushimoto et al. 2001). Les enzymes de la famille de la tyrosinase, du fait de leur détection principalement au sein des mélanosomes et du fait de la variabilité de cette détection selon le stade de biogenèse du mélanosome, constituent des marqueurs de choix des différentes étapes de cette biogenèse.

L'analyse des résultats de localisation subcellulaire montre une co-localisation de la protéine Pmel17 sauvage détectée par l'anticorps HMB45 avec les trois enzymes de la famille des tyrosinases (Figure 48, 49 et 50). L'anticorps HMB45 marque spécifiquement Pmel17 au sein du mélanosome de stade II ; dans ce compartiment la distribution de Pmel17 consiste en de fines particules compactes qui relient les noyaux de deux cellules avoisinantes. Ce profil de marquage indique une forte distribution de la protéine de la périphérie nucléaire vers le cytoplasme en accord avec les travaux de Kushimoto et Kazutomo montrant un profil de détection similaire avec l'anticorps HMB45 respectivement sur les cellules MNT1 et Melan-a (Kushimoto et al. 2001; Toyofuku et al. 2001; Toyofuku et al. 2002). Une grande partie des protéines Tyr et Tyrp1 co-localise avec la forme fibrillaire de Pmel17 reconnue par l'anticorps HMB45 indiquant que celles-ci sont majoritairement adressées aux mélanosomes matures. Tyrp2 co-localise également avec la forme fibrillaire de Pmel17 mais dans une moindre mesure comparé à Tyr et Tyrp1 en cohérence avec le fait que Tyrp2 soit détectée de façon homogène au cours des différents stades de la biogenèse du mélanosome et que Tyr et Tyrp1

soient majoritairement détectées à partir du stade II de cette biogenèse (Kushimoto et al. 2001; Raposo et al. 2001).

L'absence de marquage de la protéine Pmel17 avec l'anticorps HMB45 sur les coupes de peaux Charolaise (Figure 49) confirme le défaut d'adressage de la protéine Pmel17 Charolaise au mélanosome de stade II. Les protéines Tyr et Tyrp2 sont détectées sur les coupes de peaux Charolaise avec un profil de distribution différent de celui observé sur les coupes de peaux sauvages. Sur les coupes de peaux Charolaise, le profil de distribution des protéines Tyr et Tyrp2 est essentiellement périnucléaire, spécifique d'une localisation dans un compartiment précoce de la voie de biosynthèse (Toyofuku et al. 2001; Toyofuku et al. 2002).

L'absence de marquage de la protéine Tyrp1 sur les coupes de peaux Charolaise observée en microscopie confocale ainsi que sa très faible détection en analyse western blotting (Figure 54) sont indépendantes de l'allèle Charolais. En effet, les travaux réalisés par Guibert portant sur la quantification de transcrits *TYRP1*, *TYR* et *TYRP2* chez les races bovines de génotype *e/e* ont démontré que *TYRP1* n'était que très faiblement transcrite chez le Charolais et indétectable chez les races Limousine, Salers, Blonde d'Aquitaine, Montbéliarde et Maine-Anjou (Guibert et al. 2004). Le niveau d'expression de Tyrp1 serait directement associé au génotype *e/e*. La présence d'un récepteur Mc1r tronqué, produit de l'allèle *e*, insensible à l' $\alpha$ MSH et à Agouti, donc incapable de transmettre un signal, aurait un impact plus drastique sur la régulation de *TYRP1* comparé à *TYR* et *TYRP2* (Guibert et al. 2004).

La co-localisation des protéines Tyr et Tyrp2 avec les formes précoces de Pmel17 reconnues par l'anticorps  $\alpha$ PEP13h (Figure 51 et 52) sur les coupes de peaux sauvages et Charolaises confirme la présence de ces protéines dans des compartiments précoces de la voie de biosynthèse. Au sein des deux types de peaux, cette co-localisation est très faible. Sur les coupes de peaux sauvages, cela est prévisible et s'explique par le fait que les protéines Tyr et Tyrp2 soient majoritairement adressées aux mélanosomes comme le montrent les tests de co-localisation utilisant l'anticorps HMB45. En l'absence de mélanosomes matures au sein des coupes de peaux Charolaise nous avons supposé que les protéines Tyr et Tyrp2 devraient être majoritairement localisées avec les formes précoces de Pmel17. A l'inverse de notre supposition cette co-localisation s'est révélée très faible. Cette absence de co-localisation majeure pourrait alors s'expliquer par la prise en charge partielle de la protéine Charolaise par le système de contrôle qualité du RE. Celle-ci serait de ce fait faiblement adressée au Golgi et au pré-mélanosome. D'ailleurs, la faible co-localisation des formes précoces de la protéine

Pmel17 Charolaise avec les marqueurs spécifiques du RE et du Golgi ainsi que les analyses western blotting réalisées avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h montrant une faible détection des formes P70, iPmel17 et mPmel17 au sein des extraits protéiques Charolais, soutiennent également l'hypothèse d'une rétention partielle au niveau du RE. Il est bien admis que le système de contrôle qualité des protéines qui traverse la voie de sécrétion s'étend du RE jusqu'à la sortie du Golgi et que les protéines identifiées comme mal repliées peuvent être ré-adressées au RE pour être dégradées *via* la voie ERAD (ER-Associated Degradation) ou envoyées aux lysosomes pour être dégradées (McCracken and Brodsky 2005; Tamura et al. 2010). La portion de la protéine Pmel17 Charolaise qui est acheminée au-delà du RE ou du Golgi pourrait être prise en charge par ce mécanisme expliquant ainsi l'absence d'élaboration de la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II.

Le pré-mélanosome a une structure identique aux endosomes précoces, il est doté d'une forte activité protéolytique due à la présence de nombreuses hydrolases lysosomales (Diment et al. 1995). Dans ce compartiment, ces hydrolases sont responsables de la dégradation et du clivage partiel des protéines mélanosomales les rendant très instables. Les travaux de Kushimoto *et al* ont démontré qu'une telle dégradation altérerait la fonction catalytique des protéines Tyr et Tyrp2 inhibant ainsi la synthèse de mélanine (Kushimoto et al. 2001). C'est uniquement après l'élaboration de la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II que ces protéines deviennent actives et résistantes à la protéolyse. Dans le cas de la race bovine Charolaise où la biogenèse du mélanosome est avortée au stade pré-mélanosome, les protéines Tyr et Tyrp2 pourraient fortement subir cette dégradation. *A contrario* de cette supposition, les travaux réalisés par Guibert sur la quantification des transcrits *TYR* et *TYRP2* chez les races bovines de génotype *e/e* ont démontré un niveau de transcription plus élevé chez le bovin de race Charolaise comparé aux bovins de races Limousine, Salers, Blonde d'Aquitaine, Montbéliarde et Maine-Anjou (Guibert et al. 2004). Par ailleurs, nos analyses western blotting réalisées avec les anticorps spécifiques de ces protéines ne montrent pas de différence de détection entre les extraits protéiques Charolais comparés aux extraits protéiques sauvages pour les enzymes Tyr et Tyrp2. De plus, ces analyses ont démontré, en accord avec les travaux de Guibert, la sous-expression de l'enzyme Tyrp1 chez le bovin de race Charolaise et l'absence de cette expression chez les autres bovins de génotype *e/e* comme ceux de races Limousine et Salers. Ainsi l'absence d'élaboration de la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II aurait une incidence non pas sur le niveau d'expression des enzymes de la famille des tyrosinases, mais certainement sur l'activité catalytique de celles-ci. Cette hypothèse est également confortée par des travaux de quantification biochimique du contenu

mélanique de poils bovins montrant une plus faible activité mélanogénique chez la race Charolaise comparée à la Limousine (Renieri et al. 1993). La protéine Pmel17 serait alors susceptible de jouer un rôle dans la phéomélanogenèse chez le bovin, probablement par la stabilisation de l'activité catalytique de la tyrosinase Tyr. Il est également probable que la mutation Charolaise ait des effets dominants négatifs. La perte de fonction de Pmel17 qu'elle engendre, conduirait au blocage de la biogenèse des deux catégories de mélanosomes, aussi bien eumélanosomes que phéomélanosomes, avec pour conséquence l'inhibition totale de la synthèse de pigments. Par ailleurs, chez la souris, le fait que la mutation *silver* (*si*) ait plus d'impact sur la dilution de la coloration du pelage comparé à l'inactivation du gène, évoque des événements de gain de fonction associés aux allèles de *PMEL17* responsables des effets les plus saisissants sur la pigmentation.

L'ensemble des résultats de la démarche *in situ* démontrent que la protéine Pmel17 n'est pas complètement retenue dans le RE, une portion de celle-ci est adressée au Golgi voire au pré-mélanosome où la biogenèse du mélanosome est avortée en l'absence de formes protéiques nécessaires à l'assemblage de la matrice fibrillaire. Ils démontrent également la sous expression de la protéine Tyrp1 chez le bovin Charolais, l'absence d'expression de celle-ci chez les bovins de races Limousine et Salers, ainsi qu'un niveau d'expression équivalent des protéines Tyr et Tyrp2 chez la race Charolaise comparé aux autres races. Enfin, ces résultats supportent l'hypothèse d'une implication de la protéine Pmel17 bovine dans la phéomélanogenèse. La perte de fonction de la protéine Pmel17 Charolaise pourrait avoir pour incidence, l'inhibition de l'activité catalytique des enzymes de la famille des tyrosinases et donc l'inhibition de la mélanogenèse.

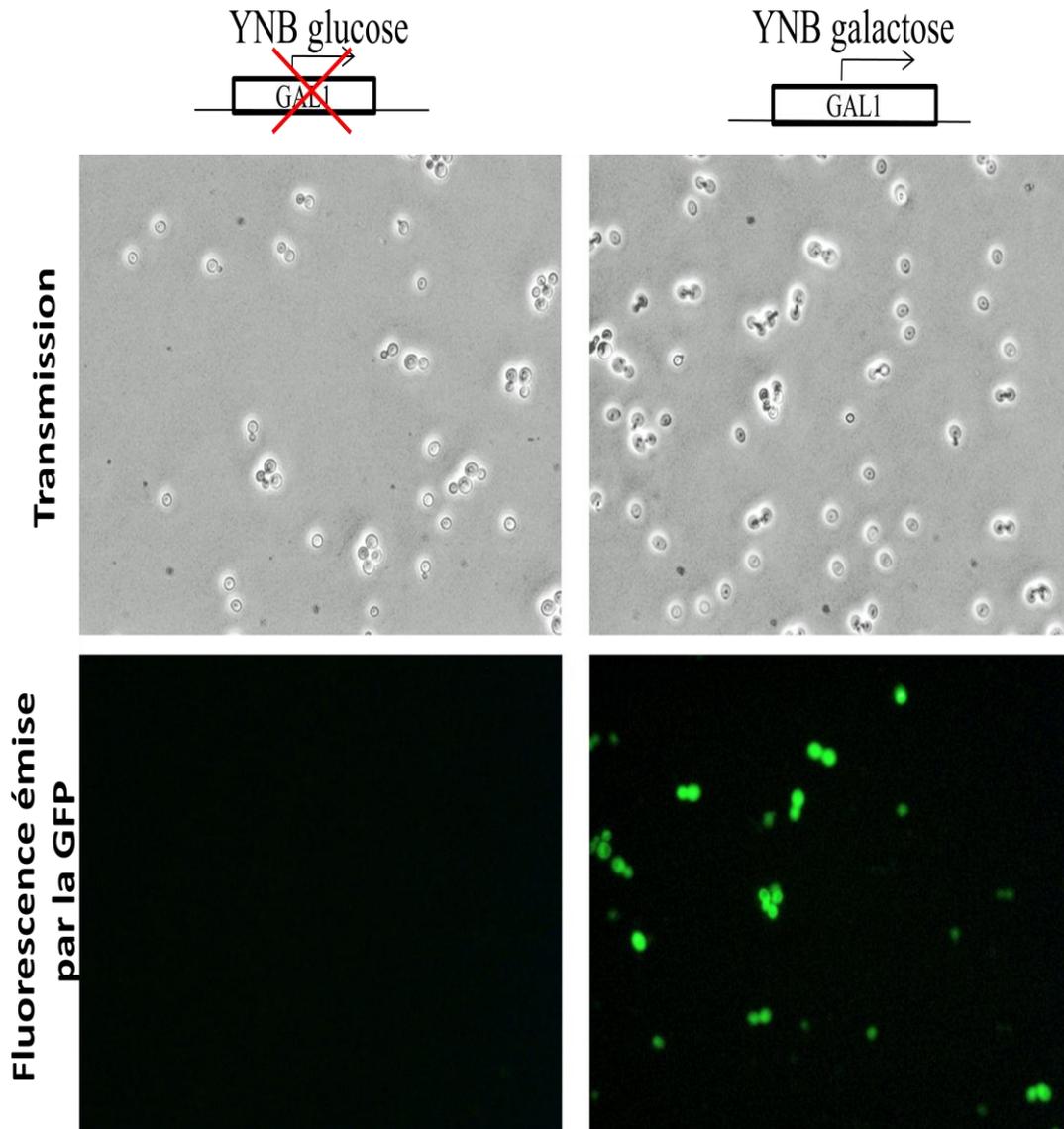
## V. EXPRESSION DE LA PROTEINE PMEL17 CHAROLAISE AU SEIN DE DIFFERENTS MODELES CELLULAIRES

Les spécificités de la protéine Pmel17 liées à sa nature pigmentaire, sa voie de biosynthèse atypique, ainsi que sa structure amyloïde représentent des contraintes pour son expression et son repliement correct dans un système cellulaire *in vitro*. Ainsi notre choix de système d'expression s'est porté sur plusieurs modèles cellulaires. Ces modèles cellulaires sont : la souche Y10000 de *Saccharomyces cerevisiae*, rare espèce eucaryote synthétisant des fibrilles amyloïdes physiologiques, les cellules pigmentaires Melan-a qui dérivent de mélanocytes de souris, les cellules COS7 (fibroblastes rénaux de singe) et les cellules CHO-K1 (cellules ovariennes de hamster) couramment utilisées comme système d'expression. Les constructions géniques *in vitro* relatives à ces systèmes d'expression ont été réalisées à l'aide de deux vecteurs, le vecteur pRS326 pour l'expression chez *Saccharomyces cerevisiae* et le vecteur pCDNA3.1 pour l'expression chez les autres types cellulaires.

Les analyses des résultats relatifs à l'expression de la protéine Pmel17 Charolaise au sein de ces modèles cellulaires sont divisées en deux parties. La première partie concerne l'expression de Pmel17 chez *Saccharomyces cerevisiae* et la seconde partie, l'expression de celle-ci dans les autres modèles cellulaires.

### 1. Expression de Pmel17 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le choix de *Saccharomyces cerevisiae* comme système d'expression de la protéine Pmel17 tire parti d'un ensemble d'avantages liés à l'utilisation de ce microorganisme. Le champignon unicellulaire *Saccharomyces* est un organisme eucaryote facile à manipuler et bénéficiant des avantages d'une croissance microbienne. La plupart des processus cellulaires fondamentaux chez cet organisme sont très proches de ceux que l'on retrouve chez les cellules des organismes supérieurs, et notamment chez l'homme. Ceci est particulièrement le cas en ce qui concerne la voie de sécrétion des protéines et les contrôles «Qualité» qui leurs sont associés. Le processus d'acheminement des protéines membranaires vers la vacuole chez *Saccharomyces cerevisiae* est similaire au processus d'acheminement de ces protéines vers le lysosome ou ses organites apparentés (mélanosome) chez les cellules de mammifère. En effet,

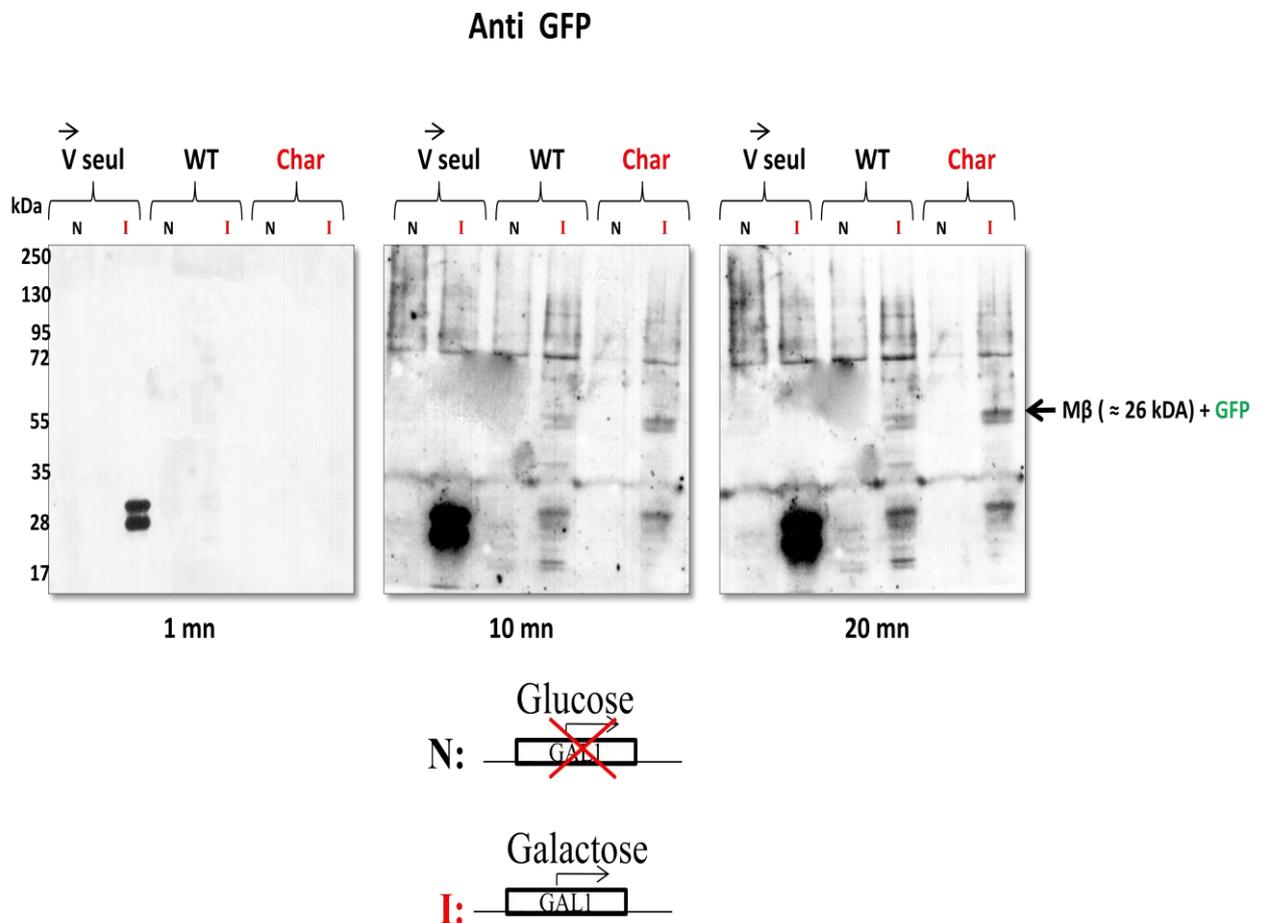


**Figure 55 : Induction de la protéine de fusion Pmel17-GFP.** La souche Y10000 [pRS326-Pmel17-GFP] a été cultivée pendant 18 h sur des milieux sélectifs contenant du Glucose (YNB Glucose) ou du Galactose (YNB Galactose), comme sources de carbone. La fluorescence associée à la GFP n'est détectée que dans les cellules cultivées en présence de galactose traduisant une transcription sélective de la protéine de fusion.

la vacuole et le lysosome sont des analogues fonctionnels et la plupart des acteurs et des intermédiaires du trafic vers le compartiment lysosomal chez les cellules de mammifères ont leurs homologues chez *Saccharomyces cerevisiae* (Bryant and Stevens 1998). De plus, à l'image de Pmel17, la capacité de certaines protéines de *Saccharomyces cerevisiae* comme Ure2p, Sup35p et Rnq1p à former des amyloïdes fonctionnelles a été mise en évidence (King et al. 1997; Taylor et al. 1999; Uptain and Lindquist 2002; True et al. 2004). De même, l'efficacité de *Saccharomyces cerevisiae* comme système d'étude des protéines amyloïdes humaines et des protéines prions de champignons a été démontrée (Gorkovskii et al. 2009; Wickner et al. 2012).

#### a. Système Y10000 [pRS326-Pmel17-GFP/6xHis]

Le vecteur pRS326 permet l'expression des protéines Pmel17 sauvage ou mutée sous la dépendance d'un promoteur (*Gali*) inductible. Un promoteur inductible est un promoteur qui est activé dans une condition physiologique particulière, ou en présence d'un composé spécifique. Dans notre cas, la molécule inductrice est le galactose. Ainsi, il nous est possible d'induire la synthèse des protéines Pmel17 sauvage et mutée par simple addition de galactose dans le milieu de culture. Par ailleurs, ce vecteur permet d'obtenir une protéine fusionnée à la GFP en C-terminal. Une deuxième version du vecteur pRS326 permettant d'obtenir une protéine de fusion avec une étiquette 6XHis en C-terminal a été établie. Les constructions nécessaires à l'expression du variant et de l'isoforme sauvage fusionnés soit avec la GFP ou l'étiquette 6XHis ont été réalisées. Après transformation de la souche de levure avec les différentes constructions, nous avons mis au point les conditions optimales de l'expression qui nous permettent de déterminer la cinétique d'induction des protéines d'intérêts et d'évaluer l'efficacité de cette induction. Nous avons dans un premier temps évalué l'induction de la protéine de fusion en cultivant parallèlement la souche Y10000 [pRS326-Pmel17-GFP] sur des milieux sélectifs contenant du Glucose (YNBGlc) ou du Galactose (YNBGal), comme sources de carbone. Comme nous pouvons l'observer (Figure 55), la fluorescence associée à la GFP n'est détectée que dans les cellules cultivées en présence de galactose (YNB Galactose), attestant du bon fonctionnement de notre système d'induction (promoteur *GALI*).



**Figure 56 : Profil de détection western blotting avec l'anticorps dirigé contre la GFP sur des extraits protéiques totaux de levures exprimant la GFP, le variant et l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés à la GFP.** Ces tests sont réalisés en présence (I) ou non (N) d'induction du promoteur Gal1. L'analyse comparée des différents profils permet d'identifier la bande qui correspond au fragment Mβ de Pmel17 au sein des extraits protéiques recombinants sauvage et charolais. Les temps indiqués sous les profils western blotting correspondent à la durée d'exposition de la membrane de nitrocellulose avec le film autoradiographique.

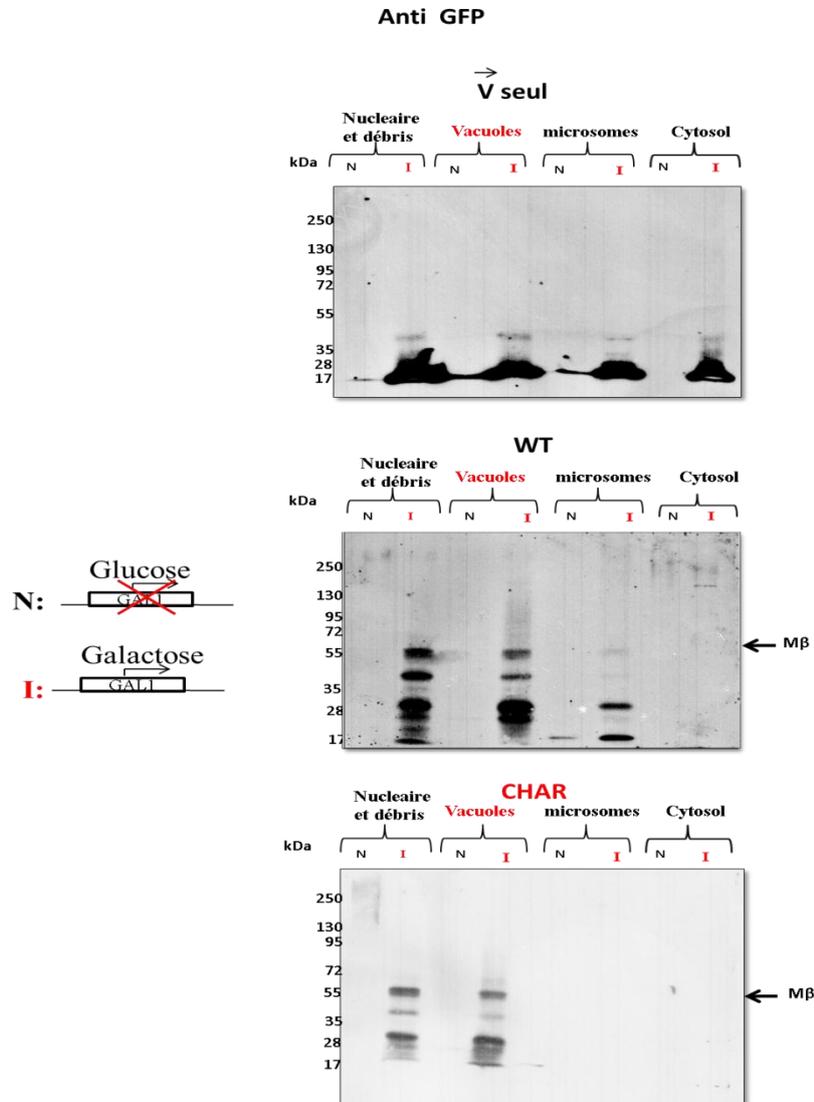
Le système d'expression mis au point, nous avons entrepris des tests de détection des protéines Pmel17 sauvage et Charolaise par analyses western blotting sur des extraits protéiques totaux de levures avec des anticorps dirigés contre la GFP et l'étiquette 6XHis. Les analyses des différents profils western blotting ont révélé la présence de nombreuses bandes différentes des formes attendues de la protéine Pmel17. Cependant, l'utilisation du système d'expression sélectif nous permet de discerner 3 types de bandes au sein des différents profils western blotting : les bandes inhérentes à l'expression de Pmel17 chez la levure, les bandes inhérentes aux étiquettes GFP et 6XHis ainsi que les bandes aspécifiques. Dans le but de simplifier la lecture des données relatives à ces analyses, seules les bandes inhérentes à l'expression de Pmel17 chez la levure seront décrites.

### **b. Analyse western blotting sur le système levure avec l'anticorps dirigé contre la GFP**

Les tests de détection western blotting avec l'anticorps anti GFP sont réalisés sur des extraits protéiques totaux provenant des souches Y10000 de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant le variant et l'isoforme Pmel17 sauvage fusionnés à la GFP ainsi que la souche Y10000 transformée avec le vecteur pRS326 sans insert. Ce dernier exprime ainsi la GFP sous forme libre non fusionnée. Il sert de contrôle négatif à l'expression des protéines de fusion. Une deuxième condition contrôle consiste à réaliser les tests sur les trois souches recombinantes en absence d'induction du promoteur Gal1. Cette condition sert de contrôle non seulement à l'expression sélective des trois protéines (Pmel17-WT-GFP, Pmel17-mutant-GFP et GFP) mais aussi de contrôle de la spécificité de l'anticorps anti GFP. L'analyse du profil western blotting est réalisée à trois temps d'exposition de la membrane de nitrocellulose avec le film autoradiographique (Figure 56).

A une minute d'exposition, deux bandes de  $\approx 26$  kDa et  $\approx 28$  kDa sont détectées au sein de l'échantillon transformé avec le vecteur vide et uniquement en présence d'induction du promoteur Gal1. Ces deux bandes correspondent à la GFP probablement à différents stades de repliement, leurs présences au sein de l'échantillon préalablement cultivé en présence d'induction du promoteur Gal1 attestent de l'efficacité du système d'expression sélectif.

A dix minutes puis plus nettement à vingt minutes d'exposition, plusieurs bandes sont détectées de manière identique au sein de tous les échantillons. Les bandes détectées même en absence d'induction du promoteur Gal1 correspondent à du marquage aspécifique. Dans la partie supérieure du profil western blotting, la présence des bandes aspécifiques de poids moléculaire supérieur à 70 kDa empêche la distinction des formes iPme117 et mPme117 dont l'expression *in vitro* est en général très faible. Dans la partie inférieure du profil western blotting, les bandes correspondant à la GFP sous forme libre sont détectées au sein des trois échantillons en présence d'induction du promoteur Gal1. En plus des bandes correspondantes à la GFP, deux bandes à  $\approx 52$  kDa et  $\approx 54$  kDa sont détectées uniquement en présence d'induction du promoteur Gal1 au sein des échantillons exprimant le variant et l'isoforme Pme117. Ces bandes spécifiques de l'expression de Pme117 correspondent au fragment M $\beta$  ( $\approx 26$  kDa) fusionné aux deux formes de la GFP ( $\approx 26$  kDa et  $\approx 28$  kDa).



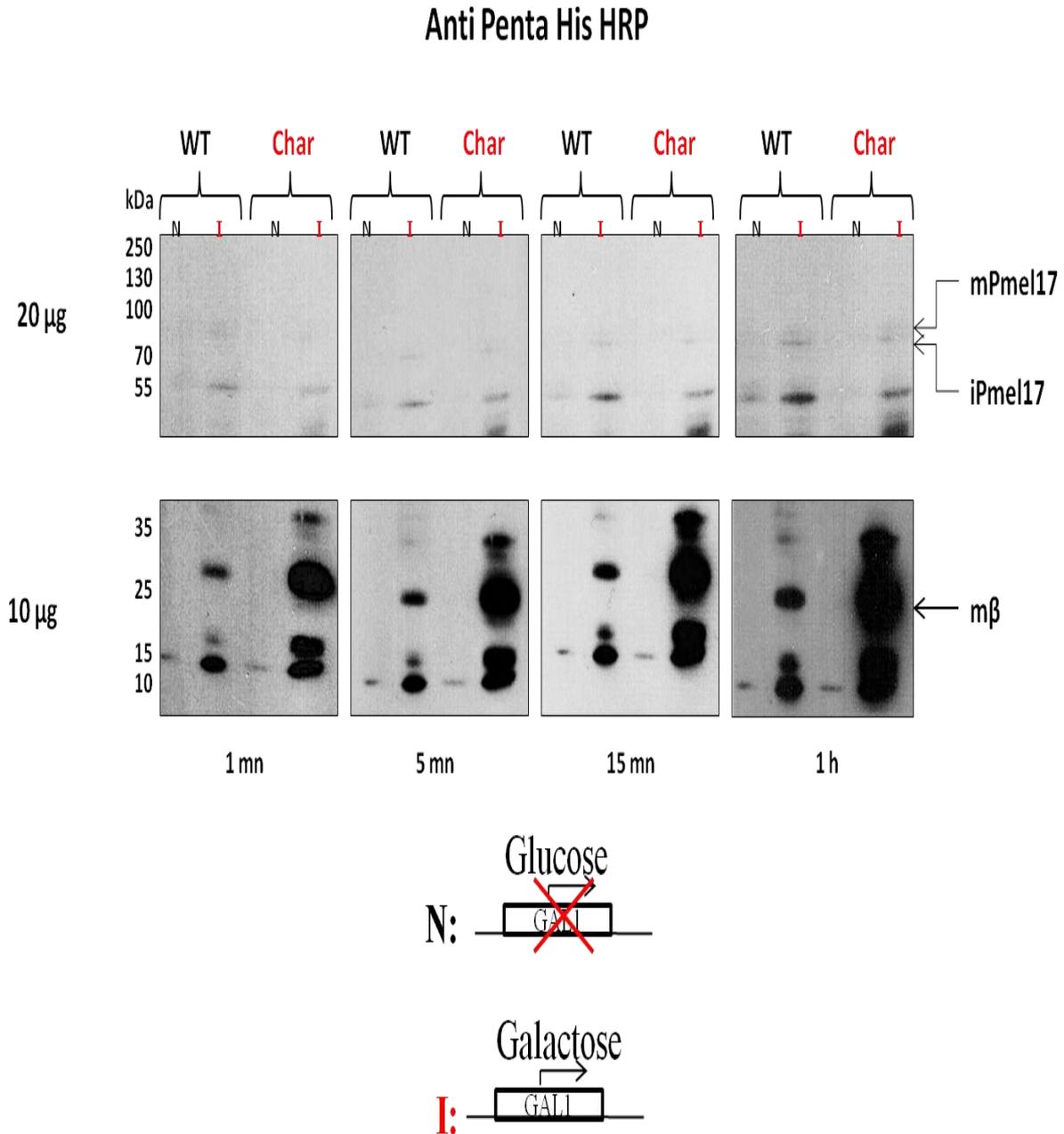
**Figure 57 : Profil de détection western blotting avec l'anticorps dirigé contre la GFP sur des fractions subcellulaires issues de levures exprimant la GFP, le variant et l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés à la GFP. Ces tests sont réalisés en présence (I) ou non (N) d'induction du promoteur Gal1. L'analyse comparée des différents profils permet d'identifier les bandes qui correspondent au fragment Mβ de Pmel17 au sein de la fraction vacuolaire des souches Y1000 recombinantes sauvage et charolais.**

### c. Analyse western blotting de fractions subcellulaires de levures avec l'anticorps dirigé contre la GFP

Afin de compléter les données d'immunofluorescence *in situ* relatives aux compartiments d'adressage du variant Pmel17, nous avons réalisé des analyses western blotting sur des fractions subcellulaires de levures exprimant la GFP, le variant et l'isoforme Pmel17 sauvage fusionnés à la GFP. Ces fractions obtenues par centrifugation différentielle (Zinser et al. 1991) sont les fractions nucléaires englobant les débris cellulaires, les fractions lysosomales (vacuoles), microsomales et cytosoliques. Trois profils western blotting sont réalisés. Ceux-ci correspondent aux fractions subcellulaires de levures exprimant la GFP, le variant et l'isoforme Pmel17 sauvage fusionnés à la GFP, cultivées en présence ou non d'induction du promoteur Gal1 (Figure 57).

Sur le profil western blotting correspondant aux échantillons transformés avec le vecteur vide, en plus des bandes correspondant à la GFP  $\approx 26$  kDa et  $\approx 28$  kDa, trois autres bandes ( $\approx 17$  kDa,  $\approx 30$  kDa et  $\approx 40$  kDa) sont détectées au sein de toutes les fractions. Celles-ci semblent inhérentes à l'expression de la GFP dans la souche Y10000.

Sur les profils western blotting correspondants aux échantillons exprimant les protéines Pmel17 sauvage et mutée, en plus des bandes inhérentes à l'expression de la GFP, les bandes de  $\approx 52$  kDa et  $\approx 54$  kDa spécifiques au fragment M $\beta$  ( $\approx 26$  kDa) fusionné aux deux formes de la GFP ( $\approx 26$  kDa et  $\approx 28$  kDa) sont détectées. Ces bandes sont détectées sur les deux profils western blotting, uniquement en présence d'induction du promoteur Gal1, au sein des fractions débris cellulaires et vacuolaire. Elles sont également détectées dans une faible proportion au sein de la fraction microsomale des échantillons exprimant la protéine Pmel17 sauvage.



**Figure 58 : Profil de détection western blotting avec l'anticorps penta His HRP sur des extraits protéiques totaux de levures exprimant le variant et l'isoforme sauvage de Pmel17 fusionnés à l'étiquette 6xHis.** Ces tests sont réalisés en présence (I) ou non (N) d'induction du promoteur Gal1. L'analyse comparée des différents profils permet d'identifier les bandes qui correspondent aux formes iPmel17, mPmel17 et Mβ au sein des extraits protéiques recombinants sauvage et charolais. Les temps indiqués sous les profils western blotting correspondent à la durée d'exposition de la membrane de nitrocellulose avec le film autoradiographique.

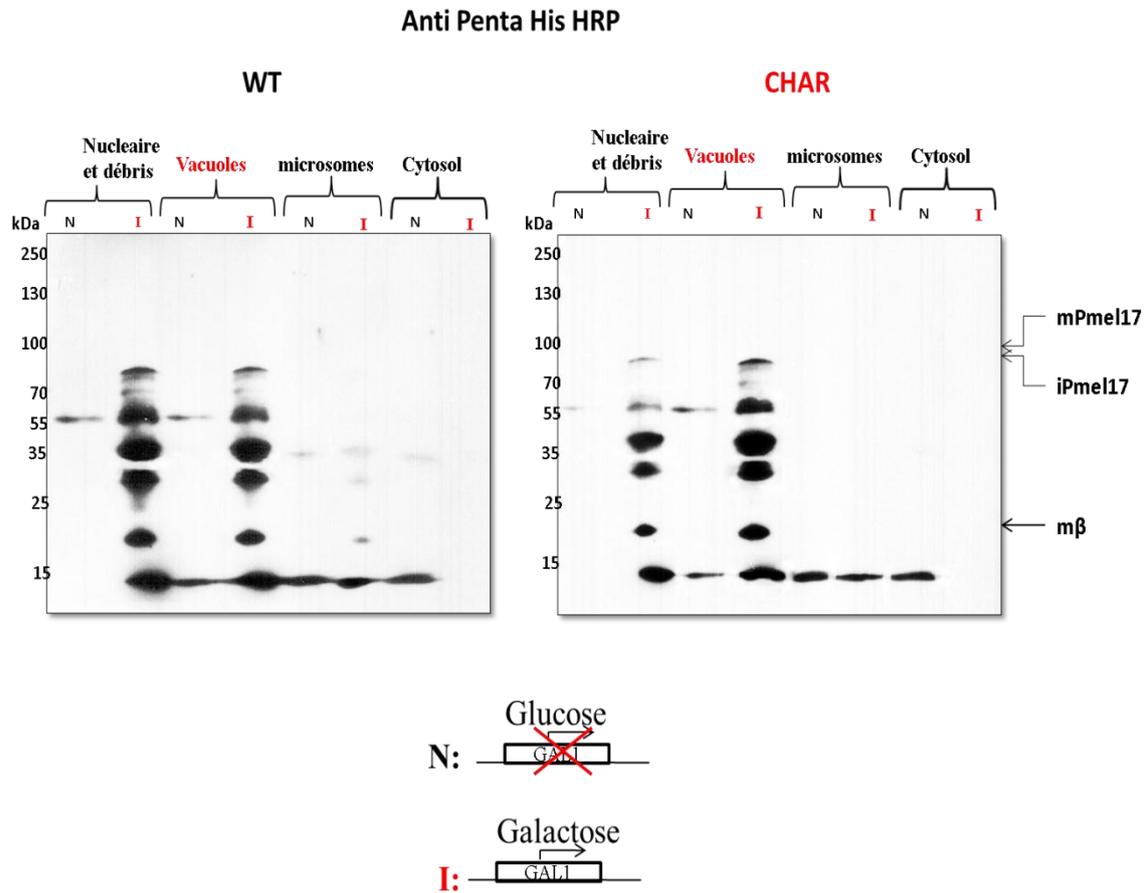
#### d. Analyse western blotting sur le système levure avec l'anticorps dirigé contre l'étiquette 6XHis

Les analyses de détection des protéines de fusion Pmel17-GFP avec l'anticorps dirigé contre la GFP ont révélé de nombreuses bandes aspécifiques de haut poids moléculaire. La présence de ces bandes n'ayant pas permis la distinction des formes i et mPmel17 au sein des échantillons exprimant le variant et l'isoforme Pmel17, d'autres analyses ont été réalisées sur des extraits protéiques totaux provenant des souches Y10000 de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant le variant et l'isoforme Pmel17 sauvage fusionnés à l'étiquette 6XHis (Figure 58).

L'analyse western blotting est réalisée comme précédemment en présence ou non d'induction du promoteur Gal1. Elle est également réalisée à quatre temps d'exposition sur deux profils western distincts qui diffèrent par la charge protéique et le poids moléculaire des protéines détectées. Les profils du haut correspondent à une charge protéique de 20 µg et regroupent les bandes d'un poids moléculaire supérieur à 35 kDa et ceux du bas correspondent à une charge protéique de 10 µg et regroupent les bandes d'un poids moléculaire inférieur ou égal à 35 kDa. L'utilisation de deux profils distincts résulte du fait que la détection des bandes de faible poids moléculaire nécessite peu de charges protéiques et de temps d'exposition contrairement aux bandes de fort poids moléculaire.

Sur les profils du bas regroupant les protéines d'un poids moléculaire inférieur ou égal à 35 kDa, quatre bandes (de  $\approx 17$  à  $\approx 35$  kDa) sont détectées au sein des échantillons exprimant le variant et l'isoforme Pmel17, uniquement en présence d'induction du promoteur Gal1. Parmi ces bandes, seule celle à  $\approx 28$  kDa correspond au poids moléculaire d'une forme de Pmel17, il s'agit du fragment M $\beta$ .

Sur le profil du haut regroupant les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 35 kDa, plusieurs bandes inhérentes à l'expression de Pmel17-6XHis chez la levure sont détectées au sein des deux extraits protéiques, uniquement en présence d'induction du promoteur Gal1. Parmi celles-ci, les bandes à  $\approx 85$  kDa et  $\approx 95$  kDa visibles au bout d'1 h d'exposition, ont un profil de détection qui correspond à celui des formes iPmel17 et mPmel17. Le fait que les poids moléculaires soient inférieurs d'environ 10 kDa par rapport à ceux attendus pour ces deux formes est imputable à l'absence de sialylation chez *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la part de modification post-traductionnelle apportée par la sialylation de Pmel17 est estimée à 10 kDa (Valencia et al. 2007).



**Figure 59 : Profil de détection western blotting avec l'anticorps dirigé contre l'étiquette 6XHis sur des fractions subcellulaires issues de levures exprimant le variant et l'isoforme sauvage de Pme17 fusionnés au 6XHis.** Ces tests sont réalisés en présence (I) ou non (N) d'induction du promoteur Gal1. L'analyse comparée des différents profils permet d'identifier les bandes qui correspondent aux fragments mPme17, iPme17, P70 et Mβ de Pme17 au sein de la fraction vacuolaire des souches Y1000 recombinantes sauvage et charolais.

### e. Analyse western blotting de fractions subcellulaires de levures avec l'anticorps Penta His HRP

L'analyse western blotting est réalisée sur les quatre fractions subcellulaires en présence ou non d'induction du promoteur Gal1. Sur les deux profils western blotting correspondants aux échantillons exprimant les protéines Pmel17 sauvage et Charolaise, des bandes sont détectées de manière identique essentiellement en présence d'induction du promoteur Gal1 et essentiellement au sein des fractions de débris cellulaires et fraction vacuolaire (Figure 59).

Le profil de détection au sein de ces fractions est similaire au profil de bandes obtenu sur les extraits protéiques totaux avec le même anticorps. Au sein de ces deux fractions, huit bandes sont détectées, celles-ci peuvent être scindées en trois groupes :

- les bandes spécifiques de l'expression de Pmel17 ( $\approx 95$  kDa,  $\approx 85$  kDa, 70 kDa et  $\approx 28$  kDa) avec une correspondance de poids moléculaire théorique. Ces bandes à  $\approx 95$  kDa,  $\approx 85$  kDa, 70 kDa et  $\approx 28$  kDa correspondent respectivement aux formes mPmel17, iPmel17, P70 et M $\beta$ . A l'exception du fragment M $\beta$  faiblement détecté au sein de la fraction microsomale des extraits recombinants sauvages, ces bandes sont exclusivement présentes au sein des fractions débris cellulaires et vacuolaire.

- Les bandes spécifiques de l'expression de la protéine Pmel17- 6XHis, inhérente au système *Saccharomyces cerevisiae*, sans correspondance de poids moléculaire théorique ( $\approx 35$  kDa et  $\approx 20$  kDa). A l'instar du fragment M $\beta$ , la bande à  $\approx 20$  kDa est faiblement détectée au sein de la fraction microsomale sauvage.

- Les bandes aspécifiques, détectées en absence d'induction du promoteur Gal1.

Les bandes détectées en absence d'induction du promoteur Gal1 au sein des autres fractions correspondent à du marquage aspécifique.

## f. Discussion relative à l'expression de Pmel17 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les tests de détection de la protéine Pmel17 exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae* ont eu pour but de vérifier d'une part, l'efficacité de ce modèle comme système d'expression de la protéine Pmel17 bovine et d'autre part, de conforter et de compléter les résultats relatifs aux approches expérimentales *in situ*. Ainsi, des analyses western blotting ont été réalisées sur des extraits protéiques totaux et des fractions subcellulaires de levures, transformées avec l'une ou l'autre des versions du vecteur pRS326.

Les analyses des différents profils western blotting ont révélé la présence de nombreuses bandes différentes des formes attendues de la protéine Pmel17. La présence de ces bandes indique un processus de maturation de Pmel17 divergent de celui observé dans les mélanocytes et met en question l'adéquation du système *Saccharomyces cerevisiae* pour l'expression de la protéine Pmel17 bovine. Cependant, l'utilisation du système d'expression sélectif nous permet de discerner 3 types de bandes au sein des différents profils western blotting : les bandes inhérentes à l'expression de Pmel17 chez la levure, les bandes inhérentes aux étiquettes GFP et 6XHis ainsi que les bandes aspécifiques.

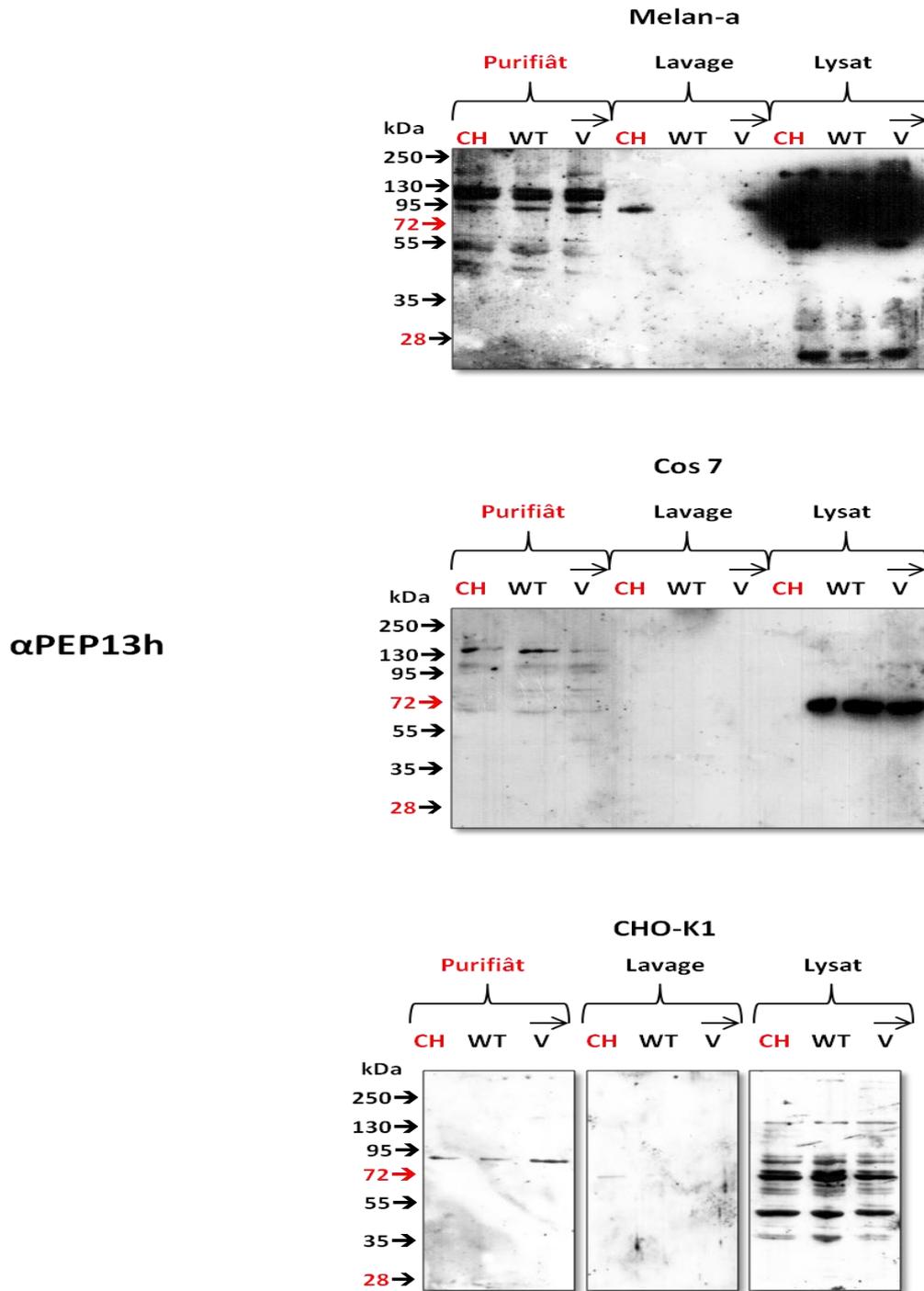
Les analyses de détection des protéines de fusion Pmel17-GFP avec l'anticorps dirigé contre la GFP (Figure 56) n'ont pas permis la détection des formes i et mPmel17. Néanmoins celles-ci ont permis, aussi bien au sein des extraits protéiques sauvage que muté, la détection du fragment M $\beta$  fusionné aux deux formes de la GFP ( $\approx$  26 kDa et  $\approx$  28 kDa), probablement différentes par leurs niveaux de glycosylation. L'absence de distinction des formes intégrales de Pmel17 (mPmel17, iPmel17 et P70) est due à un manque de spécificité de l'anticorps anti GFP qui détecte un grand nombre de bandes dans la partie supérieure du profil western blotting. Ainsi, d'autres analyses western blotting ont été réalisées à partir des souches Y10000 de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant le variant et l'isoforme Pmel17 sauvage fusionnés à l'étiquette 6XHis (Figure 58). Ces analyses ont permis en plus du fragment M $\beta$ , la détection des formes mPmel17 et iPmel17 au sein des extraits protéiques sauvage et muté. Ces analyses sont concordantes avec les analyses western blotting réalisées sur les extraits protéiques de peaux bovines avec les anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h. Elles suggèrent un processus de maturation de Pmel17 chez *Saccharomyces cerevisiae*, relativement semblable au processus de maturation au sein des mélanocytes ; cela, malgré l'absence de sialylation chez

*Saccharomyces cerevisiae* et la présence de nombreuses formes protéiques inhérentes à l'expression de Pmel17 chez cet organisme. La détection du fragment M $\beta$  au sein de l'extrait protéique Charolais laisse supposer un échappement de la protéine Pmel17 du RE vers un compartiment post-Golgien.

Afin de déterminer le compartiment d'adressage des différentes formes de Pmel17, des analyses western blotting ont été réalisées sur des fractions subcellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant les protéines de fusion Pmel17-GFP (Figure 57) ou Pmel17-6XHis (Figure 59). Ces analyses laissent supposer par deux aspects, l'adressage de la protéine Pmel17 Charolaise à un stade post-Golgien : *primo*, la détection du fragment M $\beta$  au sein des échantillons exprimant la protéine mutée et *secundo* la détection de celui-ci au sein de la fraction vacuolaire qui correspond à la fraction lysosomale des cellules de mammifères. La seule différence qui est constatée entre les échantillons exprimant les protéines Pmel17 sauvage et Charolaise est la détection du fragment M $\beta$  au sein de la fraction microsomale sauvage. Deux hypothèses pourraient expliquer cette différence. La première hypothèse est celle d'une différence de charges protéiques entre les deux échantillons. La forme M $\beta$  serait présente au sein de la fraction microsomale Charolaise, mais à défaut de charges protéiques suffisantes celle-ci ne serait pas détectée par les anticorps anti GFP et Penta-His-HRP. En effet, faute de marqueur spécifique adéquat, aucune condition contrôle de la quantité de protéines chargées n'a pu être réalisée. Néanmoins, cette hypothèse est peu probable car elle implique le clivage de la protéine Pmel17 au niveau du RE ou du Golgi. La deuxième hypothèse plus probable est celle d'une mauvaise séparation des fractions vacuolaire et microsomale. Ainsi, la détection du fragment M $\beta$  au sein de la fraction microsomale sauvage résulterait d'une contamination de celle-ci par la fraction vacuolaire. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier la pureté des fractions isolées, en réalisant des analyses western blotting de ces fractions avec des marqueurs compartimentaux qui leurs sont spécifiques.

Des analyses western blotting ont également été réalisées avec l'anticorps HMB45 spécifique de la forme mature de la protéine Pmel17 et les anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h spécifiques des formes précoces de Pmel17, sur des extraits protéiques totaux de levures. Comme on devait s'y attendre, les analyses western blotting réalisées avec l'anticorps HMB45 n'ont détecté aucun profil de bandes que ce soit au sein des extraits protéiques recombinants sauvage ou charolais. En effet, l'anticorps HMB45 reconnaît spécifiquement la forme « sialylée » du fragment RPT soluble, or la sialylation est un processus inexistant chez

*Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus avec les anticorps  $\alpha$ PEP13 et  $\alpha$ PEP13h n'ont pas été concluant, l'analyse des profils western blotting a révélé une multitude de bandes aspécifiques que ce soit en présence ou non d'induction des protéines Pmel17 sauvage et charolais. La présence de ces bandes semble inhérente au système d'expression *Saccharomyces cerevisiae* qui synthétise plusieurs protéines de types amyloïdes (King et al. 1997; Taylor et al. 1999; Uptain and Lindquist 2002; True et al. 2004).



**Figure 60** : Profil de détection western blotting avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h sur des extraits protéiques de cellules Melan-a, COS7 et CHO-K1 transfectées avec les différentes constructions pCDNA3.1. Les extraits protéiques correspondent aux différentes étapes du protocole de purification. La détection de bandes identiques entre tous les échantillons (recombinant sauvage, muté et témoin négatif) au sein des extraits purifiés démontre l'absence d'expression des protéines Pmel17 sauvage et mutée au sein de ces trois systèmes cellulaires.

## 2. Expression de Pmel17 dans les cellules Melan-a, COS7 et CHO-K1

Les cellules Melan-a sont des cellules mélanocytaires pigmentées qui expriment de manière endogène tous les intermédiaires de la synthèse de mélanine. Elles disposent donc de toute la machinerie nécessaire à la synthèse, la maturation et l'adressage de la protéine Pmel17. L'utilisation des cellules Melan-a, comme système d'expression des protéines Pmel17 bovines a pour but l'étude de l'impact de la mutation Charolaise sur le processus de glycosylation de la protéine. Pour faire la distinction entre la protéine Pmel17 exprimée de manière endogène et la protéine Pmel17 bovine issue de la recombinaison des cellules Melan-a, cette dernière devra être isolée sous forme d'extraits protéiques purifiés. Pour ce faire, nous avons utilisé le vecteur pCDNA3.1 qui permet l'expression de protéines de fusion avec une étiquette 6XHis. Cette protéine de fusion peut être isolée par affinité chélatrice avec le système de billes magnétiques NI-NTA.

Il est bien établi que l'expression de la protéine Pmel17 dans des cellules non pigmentaires comme les cellules Hela suffit à la genèse au sein des endosomes tardifs, de structures fibreuses similaires à celles que l'on retrouve dans le mélanosome de stade II (Berson et al. 2001). Ainsi, l'utilisation des cellules COS7 et CHO-K1 comme systèmes d'expression des protéines Pmel17 bovines a un double objectif. Le premier objectif est de compléter les données relatives à la localisation subcellulaire du variant Pmel17, notamment au sein des compartiments endosome et lysosome. Le second objectif est de confirmer *in vitro*, l'incapacité de la protéine Charolaise à former des structures fibreuses similaires à celles du mélanosome de stade II.

Les cellules Melan-a, COS7 et CHO-K1 ont été transfectées de manière transitoire avec les constructions pCDNA3.1 permettant l'expression des protéines Pmel17 sauvage et mutée. Une troisième transfection réalisée avec le vecteur pCDNA3.1 seul est utilisée comme contrôle négatif de l'expression des protéines Pmel17. Après transfection transitoire avec les constructions pCDNA3.1, plusieurs points de cinétique d'expression des protéines d'intérêt ont été établis. A chaque point de cinétique, des lysats cellulaires ont été réalisés dans le but d'isoler les protéines de fusion par la technique de purification avec les billes magnétiques NI-NTA. Les extraits protéiques purifiés ainsi que l'ensemble des extraits qui découlent du protocole de purification ont été analysés par western blotting avec les anticorps  $\alpha$ PEP13h, anti V5 et Penta-His-HRP (Figure 60). Seules les analyses réalisées avec l'anticorps  $\alpha$ PEP13h

révèlent des bandes au sein des profils western blotting, cependant ces bandes sont identiques entre les échantillons recombinants Pmel17 sauvage, recombinants Pmel17 mutée et le témoin négatif. Les bandes détectées au sein du profil western blotting des cellules Melan-a correspondent aux différentes formes de la protéine Pmel17 endogène. Celles détectées au sein des profils western blotting des cellules COS7 et CHO-K1 correspondent à du marquage aspécifique. Ces résultats indiquent une absence d'expression des protéines Pmel17 sauvage et mutée au sein de ces trois types cellulaires.

Le nombre de passages des cellules utilisées étant relativement faible, l'absence d'expression des protéines Pmel17 serait liée à un manque d'efficacité de la technique de transfection et/ou des agents de lipofection utilisés pour réaliser ces transfections. Il serait intéressant de réaliser des transfections stables afin d'évaluer l'expression des protéines Pmel17sauvage et mutée sur des cinétiques plus longue.

## *CONCLUSION-PERSPECTIVES*

La protéine Silver/Pmel17 est un acteur structural clé du processus de pigmentation. Elle est responsable de la formation de la matrice fibrillaire du mélanosome de stade II (Berson et al. 2001; Kushimoto et al. 2001) sur laquelle, les intermédiaires toxiques de la synthèse de mélanine sont concentrés, stabilisés et probablement neutralisés (Seiji and Iwashita 1963; Spanakis et al. 1992; Solano et al. 2000; Raposo and Marks 2002). La protéine Pmel17 aurait une fonction intrinsèque à l'eumélanogenèse. En effet, les mutations du gène *SILVER/PMEL17* observées chez la plupart des espèces sont spécifiques d'une dilution de la coloration eumélanique (Martinez-Esparza et al. 1999; Kerje et al. 2004; Brunberg et al. 2006; Clark et al. 2006). Ces mutations sont localisées essentiellement dans la partie C-terminale de la séquence du gène *SILVER/PMEL17* et affectent les domaines transmembranaire ou cytoplasmique de la protéine (Martinez-Esparza et al. 1999; Kerje et al. 2004; Brunberg et al. 2006; Clark et al. 2006).

Contrairement aux allèles du gène *SILVER/PMEL17* décrits chez les autres espèces, l'allèle Charolais (*si*) affecte la partie N-terminale de la séquence du gène. Celui-ci se caractérise par la substitution d'une Glycine par une Arginine dans le peptide signal de la protéine. Il constitue un marqueur génétique qui caractérise exclusivement les animaux de race Charolaise, auxquels il confère une robe de couleur blanche. L'association entre l'allèle (*si*) et le phénotype du bovin Charolais, suggère eu égard du génotype *e/e* de ce dernier, une éventuelle implication de la protéine Pmel17 dans la phéomélanogenèse ou alors, un effet plus drastique des mutations proches de son extrémité N-terminale sur la synthèse de pigments.

Le travail présenté dans ce mémoire a consisté à apporter des preuves fonctionnelles relatives à l'allèle Charolais du gène *SILVER/PMEL17*. L'hypothèse avancée est celle d'une perte de fonction de la protéine Pmel17 résultant de sa rétention dans le RE, suite à l'inhibition du clivage de son peptide signal. Cette hypothèse s'appuie sur la proximité de la mutation Charolaise par rapport au site de clivage du peptide signal ainsi que le changement d'hydrophobicité qu'elle engendre.

La première partie de ce travail a eu pour objectif de vérifier l'hypothèse de la rétention du variant Pmel17 au niveau du RE. Par des analyses western blotting réalisées avec les anticorps  $\alpha$ PEP13,  $\alpha$ PEP13h et HMB45 sur des échantillons de peaux bovines, nous avons démontré l'adressage du variant Pmel17 en aval du RE, sans écarter l'hypothèse de sa prise en charge partielle dans ce compartiment. Nous avons également démontré le défaut de son

adressage au mélanosome de stade II et donc l'abrogation de la biogenèse du mélanosome chez les individus Charolais.

Afin d'apporter des précisions sur le compartiment d'adressage du variant Pmel17 Charolais, nous avons réalisé des analyses de localisation subcellulaire. Ces analyses confirment l'absence d'adressage de la protéine Charolaise au mélanosome de stade II et sa localisation essentiellement au sein des stades précoces de la voie de biosynthèse, précisément au niveau du RE et du Golgi. Celles-ci étayaient également l'hypothèse d'une prise en charge partielle de la protéine Charolaise par le système de contrôle qualité du RE. Par ailleurs, nos analyses western blotting réalisées avec les anticorps spécifiques des enzymes de la famille des tyrosinases ont démontré que l'absence d'élaboration de la matrice fibrillaire n'avait pas d'incidence sur l'expression de ces enzymes. Ainsi, la perte de fonction de la protéine Pmel17 Charolaise pourrait avoir pour conséquence, l'inhibition de l'activité catalytique des enzymes de la famille des tyrosinases et donc l'inhibition de la mélanogenèse. Deux hypothèses permettraient alors d'expliquer le phénotype blanc crémeux de la robe du bovin Charolais. La première hypothèse implique un rôle de la protéine Pmel17 dans la stabilisation de l'activité catalytique de la tyrosinase Tyr, seule enzyme de la famille des tyrosinases engagée dans la phéomélanogenèse (Slominski et al. 2004). La deuxième hypothèse implique des effets de gain de fonction associés à la mutation Charolaise. Celle-ci conduirait aussi bien au blocage de la biogenèse des eumélanosomes que des phéomélanosomes, bien qu'il soit admis que la biogenèse de ce dernier ne requiert pas la formation de structure fibrillaire (Slominski et al. 2004).

Nous avons entrepris une démarche *in vitro* qui consistait à exprimer le variant et l'isoforme sauvage de la protéine Pmel17 dans des systèmes cellulaires permettant l'évaluation fonctionnelle de ce variant. Parmi les 4 types cellulaires testés, seule l'expression de Pmel17 chez *Saccharomyces cerevisiae* s'est révélée effective. L'absence d'expression de la protéine Pmel17 au sein des cellules Melan-a, COS7 et CHO-K1 pourrait être imputable à un manque d'efficacité de la technique de transfection et/ou des agents de lipofection utilisés pour réaliser ces transfections.

Les analyses de détection des formes protéiques de Pmel17 produites chez *Saccharomyces cerevisiae* concordent avec les analyses western blotting réalisées sur les extraits protéiques de peaux bovines avec les anticorps  $\alpha$ PEP13,  $\alpha$ PEP13h. Celles-ci suggèrent un processus de maturation de Pmel17 chez *Saccharomyces cerevisiae*, relativement semblable au processus de maturation au sein des mélanocytes. Ces analyses laissent supposer par deux aspects l'adressage de la protéine Pmel17 Charolaise à un stade

post Golgien : *primo*, la détection du fragment M $\beta$  au sein des échantillons exprimant la protéine mutée et *secundo* la détection de celui-ci au sein de la fraction vacuolaire qui correspond à la fraction lysosomale des cellules de mammifères. Toutefois, la pureté des fractions subcellulaires devra être confirmée par des analyses western blotting utilisant des marqueurs spécifiques de chacune de ces fractions.

Plusieurs perspectives se dégagent de ce travail. Tout d'abord, l'examen du contenu protéique des phéomélanosomes bovins permettrait d'apporter des réponses quant à l'implication de Pmel17 dans la phéomélanogenèse. Pour ce faire, il faudrait quantifier le niveau de transcription de Pmel17 sur des mélanocytes bovins en culture, préalablement traités à l'ASP, antagoniste compétitif de  $\alpha$ -MSH, dans le but d'orienter la synthèse de pigments exclusivement vers la phéomélanogenèse.

La mise en place des systèmes d'expression Melan-a, COS7 ou CHO-K1 permettrait l'évaluation fonctionnelle du variant Charolais.

L'utilisation des cellules mélanocytaires Melan-a aurait pour finalité la caractérisation du profil de glycosylation du variant Pmel17 Charolais. L'analyse du profil de glycosylation permettrait de vérifier l'association éventuelle entre la perte de fonction de Pmel17 et l'absence d'un ou plusieurs résidus glycanes à sa surface. En effet, il est démontré que des modifications post-traductionnelles comme la sialylation étaient indispensables au tri de Pmel17 au sein du mélanosome de stade II (Valencia et al. 2007).

L'utilisation des cellules COS7 ou CHO-K1 comme système d'expression de Pmel17 permettrait de vérifier par des tests de localisation subcellulaire, l'adressage du variant Pmel17 dans les compartiments endosomal et lysosomal. Ces tests permettraient ainsi de remédier à l'inefficacité de l'utilisation des marqueurs de ces compartiments sur les coupes de peaux bovines. La quantification de l'expression de Pmel17 dans ces cellules hôtes préalablement traitées avec des inhibiteurs du protéasome (MG132, MPB91...) ou des chaperonnes pharmacologiques (Miglustat, 4PBA...) permettrait de confirmer la prise en charge partielle du variant Pmel17 au niveau du RE. Elle contribuerait également à identifier les mécanismes moléculaires associés à la mutation Charolaise qui affectent l'adressage de Pmel17 au mélanosome.

L'obtention d'un modèle murin porteur de la mutation *si* constitue une des perspectives majeure de ce travail. Un tel modèle contribuerait grandement à la compréhension des effets de cette mutation au niveau moléculaire. Par ailleurs, l'obtention de modèles murins permettant une expression ectopique de la protéine Pmel17 contribuerait à la compréhension

du processus de formation des amyloïdes dans le cadre de la fonction de Pmel17. Ce modèle constituerait un outil unique pour l'étude des mécanismes de régulation qui régissent la formation des amyloïdes pathologiques (maladies d'Alzheimer, de Parkinson et les encéphalopathies spongiformes).

*BIBLIOGRAPHIE*

## -A-

- Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage DI, Jonmundsson JV (1995) Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. *J Hered* 86(5): 395-398.
- Adema GJ, de Boer AJ, Vogel AM, Loenen WA, Figdor CG (1994) Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. *J Biol Chem* 269(31): 20126-20133.
- Allison DS, Young ET (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(11): 4977-4985.
- Anderson DE (1991) Genetic study of eye cancer in cattle. *J Hered* 82(1): 21-26.
- Andersson LS, Axelsson J, Dubielzig RR, Lindgren G, Ekesten B (2011) Multiple congenital ocular anomalies in Icelandic horses. *BMC Vet Res* 7: 21.
- Andersson LS, Juras R, Ramsey DT, Eason-Butler J, Ewart S et al. (2008) Equine Multiple Congenital Ocular Anomalies maps to a 4.9 megabase interval on horse chromosome 6. *BMC Genet* 9: 88.
- Aquaron R (2000) [Human albinism: clinical, genetic, cellular, biochemical and molecular aspects]. *Med Trop (Mars)* 60(4): 331-341.
- Aydin IT, Hummler E, Smit NP, Beermann F (2012) Coat color dilution in mice because of inactivation of the melanoma antigen MART-1. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(1): 37-46.

## -B-

- Bahadoran P, Aberdam E, Mantoux F, Busca R, Bille K et al. (2001) Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol* 152(4): 843-850.
- Bahadoran P, Busca R, Chiaverini C, Westbroek W, Lambert J et al. (2003) Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J Biol Chem* 278(13): 11386-11392.
- Bailin T, Lee ST, Spritz RA (1996) Genomic organization and sequence of D12S53E (Pmel 17), the human homologue of the mouse silver (si) locus. *J Invest Dermatol* 106(1): 24-27.
- Barnard M, Lajoie G (2001) Angiomyolipoma: immunohistochemical and ultrastructural study of 14 cases. *Ultrastruct Pathol* 25(1): 21-29.
- Barsh GS (1996) The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 12(8): 299-305.
- Barton DE, Kwon BS, Francke U (1988) Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14---q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* 3(1): 17-24.
- Becerril CM, Wilcox CJ, Wiggans GR, Sigmon KN (1994) Transformation of measurements percentage of white coat color for Holsteins and estimation of heritability. *J Dairy Sci* 77(9): 2651-2657.
- Bennett DC, Lamoreux ML (2003) The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* 16(4): 333-344.
- Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR (1987) A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 39(3): 414-418.
- Berge S (1961) Influence of dun on broxn and brindle cattle. *Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* 75: 298.
- Berryere TG, Oulmoden A, Schmutz SM (2007) Genetic studies of coat colors and length in highland cattle. In: conference X, editor. *Plant and Animal Genomes*. San Diego, CA.
- Berson JF, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS (2001) Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 12(11): 3451-3464.
- Berson JF, Theos AC, Harper DC, Tenza D, Raposo G et al. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* 161(3): 521-533.
- Berzelius JJ (1840) *L* 12(8): 299-305.

- Boissy RE (2003) Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol* 12 Suppl 2: 5-12.
- Bolognia JL, Orlow SJ (2003) *Melanocyte Biology*. London: Elsevier. 937 p.
- Bomirski A, Slominski A, Bigda J (1988) The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. *Cancer Metastasis Rev* 7(2): 95-118.
- Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E et al. (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9(13): 1907-1917.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brumbaugh JA, Lee KW (1975) The gene action and function of two dopa oxidase positive melanocyte mutants of the fowl. *Genetics* 81(2): 333-347.
- Brunberg E, Andersson L, Cothran G, Sandberg K, Mikko S et al. (2006) A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet* 7: 46.
- Bryant NJ, Stevens TH (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 230-247.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Bycroft M, Bateman A, Clarke J, Hamill SJ, Sandford R et al. (1999) The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. *Embo J* 18(2): 297-305.

## -C-

- Calvo PA, Frank DW, Bieler BM, Berson JF, Marks MS (1999) A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *J Biol Chem* 274(18): 12780-12789.
- Carstam R, Brinck C, Hindemith-Augustsson A, Rorsman H, Rosengren E (1991) The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochim Biophys Acta* 1097(2): 152-160.
- Cesarini JP (1996) Melanins and their possible roles through biological evolution. *AdvSpaceRes* 18(12): 35-40.
- Chakraborty AK, Platt JT, Kim KK, Kwon BS, Bennett DC et al. (1996) Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by the pmel 17/silver locus protein. *Eur J Biochem* 236(1): 180-188.
- Charlier C, Denys B, Belanche JL, Coppieters W, Grobet L et al. (1996) Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer disease. *Mamm Genome* 7(2): 138-142.
- Chhajlani V, Wikberg JE (1992) Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309(3): 417-420.
- Clark LA, Wahl JM, Rees CA, Murphy KE (2006) Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1376-1381.
- Cleland RE, Hamilton WJ, Jr., Lindstrom EW, Ackert JE, Welch PS et al. (1940) Societies Related to the Section on Zoological Sciences (F) and the Section on Botanical Sciences (G). *Science* 91(2353): 117-119.
- Cole LJ, VAN Lone EE, Johansson I (1934) Albinotec dilution of color in cattle. *J Hered* 25: 145-156.
- Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H et al. (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 51: 287-317; discussion 318.
- Costin GE, Valencia JC, Vieira WD, Lamoreux ML, Hearing VJ (2003) Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci* 116(Pt 15): 3203-3212.

**-D-**

- De Matteis MA, Morrow JS (2000) Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113 ( Pt 13): 2331-2343.
- del Marmol V, Ito S, Jackson I, Vachtenheim J, Berr P et al. (1993) TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett* 327(3): 307-310.
- Diment S, Eidelman M, Rodriguez GM, Orlow SJ (1995) Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J Biol Chem* 270(9): 4213-4215.
- Dominice-Franchi (1999) Le mélanocyte humain in vitro moyen d'étude de la pigmentation cutanée en dermocosmétologie [Thèse de doctorat].
- Double KL, Zecca L, Costi P, Mauer M, Griesinger C et al. (2000) Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *J Neurochem* 75(6): 2583-2589.
- Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S et al. (2003) MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 163(1): 333-343.
- Dunn KJ, Williams BO, Li Y, Pavan WJ (2000) Neural crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18): 10050-10055.
- Dunn LC, Thigpen LW (1930) The silver mouse: a recessive color variation. *J Heredity* 21: 495-498.
- Dupin E, Calloni G, Real C, Goncalves-Trentin A, Le Douarin NM (2007) Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol* 330(6-7): 521-529.

**-F-**

- Feng L, Seymour AB, Jiang S, To A, Peden AA et al. (1999) The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet* 8(2): 323-330.
- Folpe AL, Goodman ZD, Ishak KG, Paulino AF, Taboada EM et al. (2000) Clear cell myomelanocytic tumor of the falciform ligament/ligamentum teres: a novel member of the perivascular epithelioid clear cell family of tumors with a predilection for children and young adults. *Am J Surg Pathol* 24(9): 1239-1246.
- Freedberg I, Eisen AZ, Wolf K, Fitzpatrick TB (1999) Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. New York: MacGraw-Hill. 2804p p.
- Fujita H, Sasano E, Yasunaga K, Furuta K, Yokota S et al. (2001) Evidence for distinct membrane traffic pathways to melanosomes and lysosomes in melanocytes. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6(1): 19-24.
- Fukuda M, Kuroda TS (2002) Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J Biol Chem* 277(45): 43096-43103.

**-G-**

- Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T et al. (1993a) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268(20): 15174-15179.
- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H et al. (1993b) Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268(11): 8246-8250.
- Girardot M, Guibert S, Laforet MP, Gallard Y, Larroque H et al. (2006) The insertion of a full-length *Bos taurus* LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande Agouti gene. *Pigment Cell Res* 19(4): 346-355.
- Giuffra E, Evans G, Tornsten A, Wales R, Day A et al. (1999) The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant white (I/KIT) locus. *Mamm Genome* 10(12): 1132-1136.

- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C et al. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391(6665): 357-362.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1): 175-182.
- Goding CR (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14(14): 1712-1728.
- Gorkovskii AA, Bezsonov EE, Plotnikova TA, Kalebina TS, Kulaev IS (2009) Revealing of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall proteins capable of binding thioflavin T, a fluorescent dye specifically interacting with amyloid fibrils. *Biochemistry (Mosc)* 74(11): 1219-1224.
- Graphodatskaya D, Joerg H, Stranzinger G (2002) Molecular and pharmacological characterisation of the MSH-R alleles in Swiss cattle breeds. *J Recept Signal Transduct Res* 22(1-4): 421-430.
- Griscelli C, Durandy A, Guy-Grand D, Daguillard F, Herzog C et al. (1978) A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am J Med* 65(4): 691-702.
- Grosz MD, MacNeil MD (1999) The "spotted" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-Cross population. *J Hered* 90(1): 233-236.
- Guaguere E, Alhaidari Z (1992) *Troubles de la pigmentation mélanique*. Paris: Elsevier. 1-8 p.
- Guibert S, Girardot M, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A (2004) Pheomelanin coat colour dilution in French cattle breeds is not correlated with the TYR, TYRP1 and DCT transcription levels. *Pigment Cell Res* 17(4): 337-345.
- Gutierrez-Gil B, Wiener P, Williams JL (2007) Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and pheomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais x Holstein population. *BMC Genet* 8: 56.

## -H-

- Halaban R, Cheng E, Svedine S, Aron R, Hebert DN (2001) Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J Biol Chem* 276(15): 11933-11938.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Harper DC, Theos AC, Herman KE, Tenza D, Raposo G et al. (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(4): 2307-2322.
- Hearing VJ (2000) The melanosome: the perfect model for cellular responses to the environment. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8: 23-34.
- Hearing VJ, Tsukamoto K (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *Faseb J* 5(14): 2902-2909.
- Hellstrom AR, Watt B, Fard SS, Tenza D, Mannstrom P et al. (2011) Inactivation of Pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. *PLoS Genet* 7(9): e1002285.
- Hirobe T, Abe H (2007a) Excess tyrosine restores the morphology and maturation of melanosomes affected by the murine slaty mutation. *Zoolog Sci* 24(4): 338-345.
- Hirobe T, Abe H (2007b) Changes of melanosome morphology associated with the differentiation of epidermal melanocytes in slaty mice. *Anat Rec (Hoboken)* 290(8): 981-993.
- Hirobe T, Wakamatsu K, Ito S (2007a) Excess tyrosine stimulates eumelanin and pheomelanin synthesis in cultured slaty melanocytes from neonatal mouse epidermis. *Zoolog Sci* 24(3): 209-217.
- Hirobe T, Abe H, Wakamatsu K, Ito S, Kawa Y et al. (2007b) 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(6): 315-330.

- Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD et al. (2005) MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* 280(14): 14006-14016.
- Hoashi T, Muller J, Vieira WD, Rouzaud F, Kikuchi K et al. (2006) The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. *J Biol Chem* 281(30): 21198-21208.
- Honing S, Sandoval IV, von Figura K (1998) A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *Embo J* 17(5): 1304-1314.
- Hou L, Panthier JJ, Arnheiter H (2000) Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. *Development* 127(24): 5379-5389.
- Huber WE, Price ER, Widlund HR, Du J, Davis IJ et al. (2003) A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* 278(46): 45224-45230.
- Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR et al. (2001) Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152(4): 795-808.

## -I-

- Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M (2000) Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J Biol Chem* 275(43): 33321-33328.
- Ito S, Wakamatsu K (2003) Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 16(5): 523-531.

## -J-

- Jackson IJ (1993) Molecular genetics. Colour-coded switches. *Nature* 362(6421): 587-588.
- Jackson IJ (1994) Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet* 28: 189-217.
- Jackson IJ (1997) Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Hum Mol Genet* 6(10): 1613-1624.
- Jackson IJ, Chambers DM, Budd PS, Johnson R (1991) The tyrosinase-related protein-1 gene has a structure and promoter sequence very different from tyrosinase. *Nucleic Acids Res* 19(14): 3799-3804.
- Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, Copeland NG, Gilbert DJ et al. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *Embo J* 11(2): 527-535.
- Jimbow K, Szabo G, Fitzpatrick TB (1974) Ultrastructural investigation of autophagocytosis of melanosomes and programmed death of melanocytes in White Leghorn feathers: a study of morphogenetic events leading to hypomelanosis. *Dev Biol* 36(1): 8-23.
- Jimbow K, Miyake Y, Homma K, Yasuda K, Izumi Y et al. (1984) Characterization of melanogenesis and morphogenesis of melanosomes by physicochemical properties of melanin and melanosomes in malignant melanoma. *Cancer Res* 44(3): 1128-1134.
- Jimbow K, Park JS, Kato F, Hirosaki K, Toyofuku K et al. (2000a) Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res* 13(4): 222-229.
- Jimbow K, Hua C, Gomez PF, Hirosaki K, Shinoda K et al. (2000b) Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in eu- and pheomelanosome biogenesis. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8: 110-117.

- Joerg H, Fries HR, Meijerink E, Stranzinger GF (1996) Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm Genome* 7(4): 317-318.
- Jones BH, Kim JH, Zemel MB, Woychik RP, Michaud EJ et al. (1996) Upregulation of adipocyte metabolism by agouti protein: possible paracrine actions in yellow mouse obesity. *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): E192-196.
- Jordan SA, Jackson IJ (2000) MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev Biol* 225(2): 424-436.

## -k-

- Kanitakis J (1997) *Structure Histologique de la peau*. 1-25 p.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X et al. (1995) Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154(8): 3961-3968.
- Kerje S, Sharma P, Gunnarsson U, Kim H, Bagchi S et al. (2004) The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the PMEL17 gene. *Genetics* 168(3): 1507-1518.
- Kim KK, Youn BS, Heng HH, Shi XM, Tsui LC et al. (1996) Genomic organization and FISH mapping of human Pmel 17, the putative silver locus. *Pigment Cell Res* 9(1): 42-48.
- King CY, Tittmann P, Gross H, Gebert R, Aebi M et al. (1997) Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms in vitro into amyloid-like filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6618-6622.
- Klinckmann G, Wegner W (1987) [Tonometry in Merle dogs]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 94(6): 337-338.
- Klinckmann G, Koniszewski G, Wegner W (1987) [Light microscopy studies of the cornea of Merle dachshunds]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 94(6): 338-341.
- Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S (1995) The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6(9): 636-639.
- Kobayashi T, Imokawa G, Bennett DC, Hearing VJ (1998) Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J Biol Chem* 273(48): 31801-31805.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G et al. (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *Embo J* 13(24): 5818-5825.
- Kornfeld S, Sly WS (1985) Lysosomal storage defects. *Hosp Pract (Off Ed)* 20(8): 71-75, 78-82.
- Kubota R, Wang Y, Minoshima S, Kudoh J, Mashima Y et al. (1995) Mapping of the human gene for a melanocyte protein Pmel 17 (D12S53E) to chromosome 12q13-q14. *Genomics* 26(2): 430-431.
- Kuliawat R, Santambrogio L (2009) A mutation within the transmembrane domain of melanosomal protein Silver (Pmel17) changes lumenal fragment interactions. *Eur J Cell Biol* 88(11): 653-667.
- Kural C, Serpinskaya AS, Chou YH, Goldman RD, Gelfand VI et al. (2007) Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5378-5382.
- Kuroda TS, Fukuda M (2004) Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat Cell Biol* 6(12): 1195-1203.
- Kuroda TS, Ariga H, Fukuda M (2003) The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes. *Mol Cell Biol* 23(15): 5245-5255.
- Kuroda TS, Fukuda M, Ariga H, Mikoshiba K (2002) Synaptotagmin-like protein 5: a novel Rab27A effector with C-terminal tandem C2 domains. *Biochem Biophys Res Commun* 293(3): 899-906.

- Kushimoto T, Basrur V, Valencia J, Matsunaga J, Vieira WD et al. (2001) A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10698-10703.
- Kushimoto T, Valencia JC, Costin GE, Toyofuku K, Watabe H et al. (2003) The Seiji memorial lecture: the melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Res* 16(3): 237-244.
- Kwon BS, Halaban R, Kim GS, Usack L, Pomerantz S et al. (1987) A melanocyte-specific complementary DNA clone whose expression is inducible by melanotropin and isobutylmethyl xanthine. *Mol Biol Med* 4(6): 339-355.
- Kwon BS, Halaban R, Ponnazhagan S, Kim K, Chintamaneni C et al. (1995) Mouse silver mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of Pmel 17. *Nucleic Acids Res* 23(1): 154-158.
- Kwon BS, Chintamaneni C, Kozak CA, Copeland NG, Gilbert DJ et al. (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(20): 9228-9232.

## -L-

- Labbe O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M (1994) Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 33(15): 4543-4549.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Land EJ, Ramsden CA, Riley PA (2003) Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines. *Acc Chem Res* 36(5): 300-308.
- Lantuejoul S, Isaac S, Pinel N, Negoescu A, Guibert B et al. (1997) Clear cell tumor of the lung: an immunohistochemical and ultrastructural study supporting a pericytic differentiation. *Mod Pathol* 10(10): 1001-1008.
- Lauvergne JJ, Ollivier L (1966) [Apropos of the coloration seen during crosses between Pietrain swine and Large White swine]. *Ann Genet* 9(1): 39-41.
- Le Borgne R, Planque N, Martin P, Dewitte F, Saule S et al. (2001) The AP-3-dependent targeting of the melanosomal glycoprotein QNR-71 requires a di-leucine-based sorting signal. *J Cell Sci* 114(Pt 15): 2831-2841.
- Lee ZH, Hou L, Moellmann G, Kuklinska E, Antol K et al. (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(4): 605-610.
- Leonhardt RM, Vigneron N, Rahner C, Van den Eynde BJ, Cresswell P (2010) Endoplasmic reticulum export, subcellular distribution, and fibril formation by Pmel17 require an intact N-terminal domain junction. *J Biol Chem* 285(21): 16166-16183.
- Leonhardt RM, Vigneron N, Hee JS, Graham M, Cresswell P (2013) Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils. *Mol Biol Cell* 24(7): 964-981.
- Lerner AB (1961) Hormones and skin color. *Sci Am* 205: 98-108.
- Levine N, Sheftel SN, Eytan T, Dorr RT, Hadley ME et al. (1991) Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin. *Jama* 266(19): 2730-2736.
- Lin JY, Fisher DE (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. 843-850 p.
- Lindquist NG, Larsson BS, Lyden-Sokolowski A (1987) Neuromelanin and its possible protective and destructive properties. *Pigment Cell Res* 1(3): 133-136.
- Linnekin D (1999) Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31(10): 1053-1074.

- Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS (2008) L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol* 6(9): e236.
- Luo D, Chen H, Jimbow K (1994) Cotransfection of genes encoding human tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 prevents melanocyte death and enhances melanin pigmentation and gene expression of Lamp-1. *Exp Cell Res* 213(1): 231-241.

## -M-

- Magnusson S, Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, Petersen TE (1975) Proceedings: Complete primary structure of prothrombin. Partial primary structures of plasminogen and hirudin. *Thromb Diath Haemorrh* 34(2): 562-563.
- Majeskie JL (1970) Characteristics and inheritance of certain coat colors and patterns in cattle. Manhattan, Kansas: Kansas state university.
- Manga P, Sato K, Ye L, Beermann F, Lamoreux ML et al. (2000) Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro. *Pigment Cell Res* 13(5): 364-374.
- Maresh GA, Wang WC, Beam KS, Malacko AR, Hellstrom I et al. (1994a) Differential processing and secretion of the melanoma-associated ME20 antigen. *Arch Biochem Biophys* 311(1): 95-102.
- Maresh GA, Marken JS, Neubauer M, Aruffo A, Hellstrom I et al. (1994b) Cloning and expression of the gene for the melanoma-associated ME20 antigen. *DNA Cell Biol* 13(2): 87-95.
- Marks MS, Seabra MC (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 738-748.
- Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Bennett DC, Lozano JA, Solano F et al. (1999) The mouse silver locus encodes a single transcript truncated by the silver mutation. *Mamm Genome* 10(12): 1168-1171.
- Matesic LE, Yip R, Reuss AE, Swing DA, O'Sullivan TN et al. (2001) Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10238-10243.
- Mayer TC (1973) The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol* 34(1): 39-46.
- McCracken AA, Brodsky JL (2005) Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival. *Curr Top Microbiol Immunol* 300: 17-40.
- McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G et al. (2002) *Bcl2* regulation by the melanocyte master regulator *Mitf* modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109(6): 707-718.
- McGlinchey RP, Shewmaker F, McPhie P, Monterroso B, Thurber K et al. (2009) The repeat domain of the melanosome fibril protein *Pmel17* forms the amyloid core promoting melanin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13731-13736.
- Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F et al. (2000) Mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 25(2): 173-176.
- Mochii M, Agata K, Eguchi G (1991) Complete sequence and expression of a cDNA encoding a chicken 115-kDa melanosomal matrix protein. *Pigment Cell Res* 4(1): 41-47.
- Mochii M, Agata K, Kobayashi H, Yamamoto TS, Eguchi G (1988) Expression of gene coding for a melanosomal matrix protein transcriptionally regulated in the transdifferentiation of chick embryo pigmented epithelial cells. *Cell Differ* 24(1): 67-74.
- Moriyama K, Bonifacino JS (2002) *Pallidin* is a component of a multi-protein complex involved in the biogenesis of lysosome-related organelles. *Traffic* 3(9): 666-677.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257(5074): 1248-1251.

## -N-

- Nichols SE, Harper DC, Berson JF, Marks MS (2003) A novel splice variant of Pmel17 expressed by human melanocytes and melanoma cells lacking some of the internal repeats. *J Invest Dermatol* 121(4): 821-830.
- Nordlund JJ, Majumder PP (1997) Recent investigations on vitiligo vulgaris. *Dermatol Clin* 15(1): 69-78.

## -O-

- Oetting WS, King RA (1999) Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat* 13(2): 99-115.
- Ogawa H, Tu CH, Kagamizono H, Soki K, Inoue Y et al. (1997) Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle. *Am J Vet Res* 58(11): 1221-1226.
- Olson TA (1975) An analysis of the inheritance of coat colour in cattle. Iowa: Iowa state university, Ames.
- Olson TA (1980) Choice of wild-type standard in colour genetics of domestic cattle. *Journal of heredity* 71: 442-444.
- Olson TA (1982) Inheritance of coat color in cattle: a review. Iowa state university and agricultural experiment: Station bulletin 595, Iowa.
- Olson TA. *The genetics of Cattle*; 1999; Wallingford, Oxon.
- Orlow SJ, Zhou BK, Boissy RE, Pifko-Hirst S (1993) Identification of a mammalian melanosomal matrix glycoprotein. *J Invest Dermatol* 101(2): 141-144.
- Ortonne JP, Benedetto JP (1981) Mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires. *Ann Génét Sél anim* 13.1: 17-26.
- Oulmouden A, Julien R, Laforêt MP, Leveziel H. Use of silver gene for authentication of the racial origin of animal populations, and of the derivative products thereof; 2005 Nov.

## -P-

- Paine C, Sharlow E, Liebel F, Eisinger M, Shapiro S et al. (2001) An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway. *J Invest Dermatol* 116(4): 587-595.
- Parks H, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest B (2009) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*(66(9)): 1493-1506.
- Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O et al. (1997) Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 16(3): 289-292.
- Pawelek JM (1991) After dopachrome? *Pigment Cell Res* 4(2): 53-62.
- Peters EM, Tobin DJ, Botchkareva N, Maurer M, Paus R (2002) Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. *J Histochem Cytochem* 50(6): 751-766.
- Petersen WE, Gilmore LO, Fitch JB, Winters LM (1944) Albinism in cattle. *J Hered* 35: 135-144.
- Prota G (1992) The role of peroxidase in melanogenesis revisited. *Pigment Cell Res Suppl* 2: 25-31.
- Prota G (1993) Regulatory mechanisms of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept. *J Invest Dermatol* 100(2 Suppl): 156S-161S.
- Prota G (1995) The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr Chem Org Naturst* 64: 93-148.
- Prota G, d'Ischia M (1993) Neuromelanin: a key to Parkinson's disease. *Pigment Cell Res* 6(5): 333-335.

- Prota G, d'Ischia M, Mascagna D (1994) Melanogenesis as a targeting strategy against metastatic melanoma: a reassessment. *Melanoma Res* 4(6): 351-358.
- Prota G, Lamoreux ML, Muller J, Kobayashi T, Napolitano A et al. (1995) Comparative analysis of melanins and melanosomes produced by various coat color mutants. *Pigment Cell Res* 8(3): 153-163.

## -Q-

- Quevedo WJ, Fleischmann RD, Dyckman RD (1981) Premature loss of melanocytes from hair follicles of light (Blt) and silver (si) mice. *Pigment Cell Phenotypic expression*, University of Tokyo Press: 177-183.

## -R-

- Rao C, Foernzler D, Loftus SK, Liu S, McPherson JD et al. (2003) A defect in a novel ADAMTS family member is the cause of the belted white-spotting mutation. *Development* 130(19): 4665-4672.
- Raposo G, Marks MS (2002) The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* 3(4): 237-248.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 152(4): 809-824.
- Reetz I, Stecker M, Wegner W (1977) [Audiometric findings in dachshunds (merle gene carriers)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 84(7): 273-277.
- Reid K, Turnley AM, Maxwell GD, Kurihara Y, Kurihara H et al. (1996) Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* 122(12): 3911-3919.
- Renieri C, Ceccarelli P, Gargiulo AM, Lauvergne JJ, Monacelli G (1993) Chemical and electron microscopic studies of cattle (*Bos taurus*) with four types of phenotypic pigmentation. *Pigment Cell Res* 6(3): 165-170.
- Riley PA (1997) Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29(11): 1235-1239.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L et al. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72(6): 827-834.
- Roselli-Rehfuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ et al. (1993) Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 8856-8860.
- Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, Warhurst A, Oliver RL et al. (2007) Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *Faseb J* 21(8): 1844-1856.
- Rouzaud F, Martin J, Gallet PF, Delourme D, Goulemot-Leger V et al. (2000) A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet Sel Evol* 32(5): 511-520.

## -S-

- Salopek TG, Jimbow K (1996) Induction of melanogenesis during the various melanoma growth phases and the role of tyrosinase, lysosome-associated membrane proteins, and p90 calnexin in the melanogenesis cascade. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1(2): 195-202.
- Sarangarajan R, Budev A, Zhao Y, Gahl WA, Boissy RE (2001) Abnormal translocation of tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 in cutaneous melanocytes of Hermansky-Pudlak Syndrome

- and in melanoma cells transfected with anti-sense HPS1 cDNA. *J Invest Dermatol* 117(3): 641-646.
- Schallreuter KU, Moore J, Tobin DJ, Gibbons NJ, Marshall HS et al. (1999) alpha-MSH can control the essential cofactor 6-tetrahydrobiopterin in melanogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 885: 329-341.
- Schonthaler HB, Lampert JM, von Lintig J, Schwarz H, Geisler R et al. (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(2): 421-436.
- Schraermeyer U, Peters S, Thumann G, Kociok N, Heimann K (1999) Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway. *Exp Eye Res* 68(2): 237-245.
- Scott G, Zhao Q (2001) Rab3a and SNARE proteins: potential regulators of melanosome movement. *J Invest Dermatol* 116(2): 296-304.
- Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden BC (2002) Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci* 115(Pt 7): 1441-1451.
- Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M et al. (2004) Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol* 122(5): 1214-1224.
- Searle AG (1968) An extension series in the mouse. *J Hered* 59(6): 341-342.
- Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M et al. (2000a) Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol* 115(2): 162-167.
- Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M et al. (2000b) The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 254(1): 25-32.
- Seiji M, Iwashita S (1963) On the Site of Melanin Formation in Melanocytes. *J Biochem* 54: 465-467.
- Seiji M, Shimao K, Birbeck MS, Fitzpatrick TB (1963) Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 100: 497-533.
- Seitz JJ, Schmutz SM, Thue TD, Buchanan FC (1999) A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle. *Mamm Genome* 10(7): 710-712.
- Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S et al. (2000) The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci* 113 ( Pt 17): 3093-3101.
- Siegrist W, Drozd R, Cotti R, Willard DH, Wilkison WO et al. (1997) Interactions of alpha-melanotropin and agouti on B16 melanoma cells: evidence for inverse agonism of agouti. *J Recept Signal Transduct Res* 17(1-3): 75-98.
- Silver LM (1995) *Mouse genetics: concepts and application*. Oxford university press.
- Silvers W (1979) *The coat colors of mice*. New York: Springer-Verlag.
- Simmen T, Schmidt A, Hunziker W, Beermann F (1999) The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal. *J Cell Sci* 112 ( Pt 1): 45-53.
- Slominski A, Paus R (1990) Are L-tyrosine and L-dopa hormone-like bioregulators? *J Theor Biol* 143(1): 123-138.
- Slominski A, Paus R, Costantino R (1991) Differential expression and activity of melanogenesis-related proteins during induced hair growth in mice. *J Invest Dermatol* 96(2): 172-179.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84(4): 1155-1228.
- Smyth JR ( 1990 ) *Genetics of plumage, skin and pigmentation in chickens*; Crawford ebRD, editor. New York: Elsevier Science. pp 109–167 p.
- Solano F, Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Hill SP, Lozano JA et al. (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.

- Sottrup-Jensen L, Zajdel M, Claeys H, Petersen TE, Magnusson S (1975) Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(7): 2577-2581.
- Spanakis E, Lamina P, Bennett DC (1992) Effects of the developmental colour mutations silver and recessive spotting on proliferation of diploid and immortal mouse melanocytes in culture. *Development* 114(3): 675-680.
- Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N et al. (2006) Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 295(1): 232-249.
- Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA (2004) Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38: 365-411.
- Stepien KB, Dworzanski JP, Bilinska B, Porebska-Budny M, Hollek AM et al. (1989) Catecholamine melanins. Structural changes induced by copper ions. *Biochim Biophys Acta* 997(1-2): 49-54.
- Strom M, Hume AN, Tarafder AK, Barkagianni E, Seabra MC (2002) A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J Biol Chem* 277(28): 25423-25430.
- Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA (1996) Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 137(5): 1627-1633.
- Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S et al. (1997) Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol* 108(6): 838-842.

## -T-

- Tamate HB, Takeuchi T (1984) Action of the e locus of mice in the response of phaeomelanin hair follicles to alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro. *Science* 224(4654): 1241-1242.
- Tamura T, Sunryd JC, Hebert DN (2010) Sorting things out through endoplasmic reticulum quality control. *Mol Membr Biol* 27(8): 412-427.
- Tang BL (2001) ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 33(1): 33-44.
- Tassabehji M, Newton VE, Read AP (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet* 8(3): 251-255.
- Taylor KL, Cheng N, Williams RW, Steven AC, Wickner RB (1999) Prion domain initiation of amyloid formation in vitro from native Ure2p. *Science* 283(5406): 1339-1343.
- Theos AC, Truschel ST, Raposo G, Marks MS (2005) The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res* 18(5): 322-336.
- Theos AC, Berson JF, Theos SC, Herman KE, Harper DC et al. (2006) Dual loss of ER export and endocytic signals with altered melanosome morphology in the silver mutation of Pmel17. *Mol Biol Cell* 17(8): 3598-3612.
- Tomita Y, Takeda A, Okinaga S, Tagami H, Shibahara S (1989) Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 164(3): 990-996.
- Toyofuku K, Wada I, Valencia JC, Kushimoto T, Ferrans VJ et al. (2001) Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. *Faseb J* 15(12): 2149-2161.
- Toyofuku K, Valencia JC, Kushimoto T, Costin GE, Virador VM et al. (2002) The etiology of oculocutaneous albinism (OCA) type II: the pink protein modulates the processing and transport of tyrosinase. *Pigment Cell Res* 15(3): 217-224.
- True HL, Berlin I, Lindquist SL (2004) Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* 431(7005): 184-187.

Tsukamoto K, Palumbo A, D'Ischia M, Hearing VJ, Prota G (1992) 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid is incorporated in mammalian melanin. *Biochem J* 286 ( Pt 2): 491-495.

## -U-

Uptain SM, Lindquist S (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* 56: 703-741.

## -V-

Valencia JC, Hoashi T, Pawelek JM, Solano F, Hearing VJ (2006a) Pmel17: controversial indeed but critical to melanocyte function. *Pigment Cell Res* 19(3): 250-252; author reply 253-257.

Valencia JC, Watabe H, Chi A, Rouzaud F, Chen KG 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(Pt 6): 1080-1091.

Valencia JC, Rouzaud F, Julien S, Chen KG, Passeron T 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(15): 11266-11280.

Vallee RB, Wall JS, Paschal BM, Shpetner HS (1988) Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* 332(6164): 561-563.

Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J (2006) The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7(7): 769-778.

Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33(3): 151-208.

Vijayasaradhi S, Duskoch PM, Wolchok J, Houghton AN (1995a) Melanocyte differentiation marker gp75, the brown locus protein, can be regulated independently of tyrosinase and pigmentation. *J Invest Dermatol* 105(1): 113-119.

Vijayasaradhi S, Xu Y, Bouchard B, Houghton AN (1995b) Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J Cell Biol* 130(4): 807-820

Volland C, Garnier C, Haguenaer-Tsapis R (1992) In vivo phosphorylation of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* 267(33): 23767-23771.

## -W-

Wasmeier C, Hume AN, Bolasco G, Seabra MC (2008) Melanosomes at a glance. *J Cell Sci* 121(Pt 24): 3995-3999.

Watabe H, Valencia JC, Yasumoto K, Kushimoto T, Ando H et al. (2004) Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. *J Biol Chem* 279(9): 7971-7981.

Watabe H, Valencia JC, Le Pape E, Yamaguchi Y, Nakamura M et al. (2008) Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking. *J Invest Dermatol* 128(1): 162-174.

Weber WW, Mamunes P, Day R, Miller P (1964) Trisomy 17-18(E): Studies in Long-Term Survival with Report of Two Autopsied Cases. *Pediatrics* 34: 533-541.

Wickner RB, Kryndushkin D, Shewmaker F, McGlinchey R, Edskes HK (2012) Study of amyloids using yeast. *Methods Mol Biol* 849: 321-346.

Wilson YM, Richards KL, Ford-Perriss ML, Panthier JJ, Murphy M (2004) Neural crest cell lineage segregation in the mouse neural tube. *Development* 131(24): 6153-6162.

Wu X, Wang F, Rao K, Sellers JR, Hammer JA, 3rd (2002) Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol Biol Cell* 13(5): 1735-1749.

Wu X, Rao K, Bowers MB, Copeland NG, Jenkins NA et al. (2001) Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci* 114(Pt 6): 1091-1100.

## -Y-

Yamaguchi Y, Hearing VJ (2009) Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35(2): 193-199.

Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ (2007) The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 282(38): 27557-27561.

Yamasaki S, Tanaka S, Fujii H, Matsumoto T, Okuda C et al. (2000) Monotypic epithelioid angiomyolipoma of the liver. *Histopathology* 36(5): 451-456.

Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem* 272(1): 503-509.

Yasumoto K, Watabe H, Valencia JC, Kushimoto T, Kobayashi T et al. (2004) Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J Biol Chem* 279(27): 28330-28338.

Yokoyama K, Yasumoto K, Suzuki H, Shibahara S (1994) Cloning of the human DOPAchrome tautomerase/tyrosinase-related protein 2 gene and identification of two regulatory regions required for its pigment cell-specific expression. *J Biol Chem* 269(43): 27080-27087.

Yoshida H, Kunisada T, Kusakabe M, Nishikawa S, Nishikawa SI (1996) Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development* 122(4): 1207-1214.

## -Z-

Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG et al. (2001) Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* 54(6): 414-418.

Zhou BK, Kobayashi T, Donatien PD, Bennett DC, Hearing VJ et al. (1994) Identification of a melanosomal matrix protein encoded by the murine si (silver) locus using "organelle scanning". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15): 7076-7080.

Ziehl MA, Hollander WF, (1987) DUN, a new plumage-color mutant at the I-locus in the fowl (*Gallus gallus*). *Iowa State J Res*: 62: 337-342.

Zinser E, Sperka-Gottlieb CD, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F et al. (1991) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173(6): 2026-2034.

## Coloration de la robe chez le bovin. Etude fonctionnelle de l'allèle (*si*) du gène *SILVER/PMEL17* chez la race Charolaise.

Dans le cadre des travaux de recherche de marqueurs génétiques utilisables comme outils d'authentification de l'origine raciale des bovins, l'équipe coloration de l'UMR1061 a mis en évidence un marqueur génétique de la race Charolaise. Il s'agit de l'allèle *si* (*Dc*) du gène *SILVER/PMEL17*, acteur crucial de la biogenèse du mélanosome. Le phénotype blanc crémeux que cet allèle confère à la robe du bovin Charolais serait la conséquence d'une perte de fonction de la protéine Silver/Pmel17. Celle-ci serait retenue dans le réticulum endoplasmique (RE) suite à l'inhibition exercée par la mutation *si* sur le clivage de son peptide signal. Dans l'objectif d'apporter des preuves fonctionnelles relatives à l'allèle Charolais du gène *SILVER/PMEL17*, nous avons entrepris des approches *in situ* et *in vitro*. La démarche *in situ* nous a permis de démontrer la rétention partielle de la protéine Pmel17 Charolaise au niveau du RE ainsi que le défaut de son adressage au mélanosome de stade II et donc l'abrogation de la biogenèse du mélanosome chez les individus Charolais. La démarche *in vitro* nous a permis de valider le modèle *Saccharomyces cerevisiae* comme système d'expression de la protéine Silver/Pmel17 et de conforter les données relatives aux approches *in situ*.

**Mots clés :** Silver/Pmel17, mélanine, mélanosome, mélanocyte, peptide signal, Charolais, robes bovines.



### Cattle coat colour. Functional study of (*si*) allele of *SILVER/PMEL17* gene in the Charolais breed.

The search of genetic markers that could be used as authentication tools for cattle breeds tractability, has allowed our team UMR1061 the identification of a genetic marker for the Charolais breed. This genetic marker corresponds to *si* (*Dc*) allele of *SILVER/PMEL17* gene whose the product plays a relevant role in the melanosome biogenesis. Otherwise, this allele is genetically associated with creamy white phenotype of the Charolais breed. Since the mutation affects the signal peptide, we have hypothesized that Pmel17 produced by the *si* allele is retained within the endoplasmic reticulum and does not contribute to the melanosome maturation.

In order to provide functional evidence concerning *si* allele, both *in situ* and *in vitro* experiments were performed. The *in situ* approach allowed us to demonstrate a partial retention of the protein Pmel17 Charolais within ER and its failure to reach the melanosome stage II and therefore the repeal of melanosome biogenesis. The *in vitro* approach that we have developed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* allowed us to consolidate the results obtained *in situ*.

**Keywords:** Silver/Pmel17, melanin, melanosome, melanocyte, signal peptide, Charolais, cattle, coat.