

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ANNEXES.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15

PREMIERE PARTIE : Histoire des couleurs caramel et abricot chez le chat

I- LES COULEURS ET MOTIFS DE ROBES CHEZ LE CHAT : DESCRIPTION ET DETERMINISMES GENETIQUES	17
A- Les couleurs.....	17
a) Couleurs de base de la robe	17
b) Modification de la couleur de base	21
B- Les motifs.....	23
a) Colourpoint, sépia et mink.....	23
b) Tabby.....	24
c) Marques blanches.....	25
C- Le caramel et l'abricot	25
II- HISTOIRE DES COULEURS CAMEL ET ABRICOT CHEZ LE CHAT	28
A- Apparition des robes caramel et abricot	28
B- Reconnaissance des couleurs caramel et abricot dans le monde	29
a) Situation dans le monde.....	29
b) Situation en France	29
III- DESCRIPTION DES ROBES CAMEL ET ABRICOT	30
A- Descriptif des robes caramel et abricot	30
B- Illustrations de chats caramel et abricot	32
a) Chats caramel sur base bleue.....	32
b) Chats caramel sur base lilas	35
c) Chat caramel sur base faon	36
d) Chats abricot.....	36

DEUXIEME PARTIE : Etude bibliographique de la mélanogenèse et de son déterminisme génétique

I- LE SYSTEME PIGMENTAIRE	41
A- Développement embryologique des mélanocytes.....	41
a) Origine embryologique des mélanocytes.....	41
b) Migration et prolifération des mélanoblastes	42
c) Colonisation des follicules pileux en formation par les mélanoblastes et les mélanocytes épidermiques.....	43

d)	Différenciation des mélanoblastes en mélanocytes	45
B-	Le mélanocyte au sein du système pigmentaire	46
a)	Structure du mélanocyte	46
b)	Place des mélanocytes dans le tégument	47
C-	Place des mélanocytes dans le cycle pilaire.....	48
a)	Le système pilaire	48
b)	Le cycle pilaire	49
c)	La mélanogenèse au cours du cycle pilaire	50
II-	ACQUISITION DE LA PIGMENTATION	51
A-	La mélanogenèse.....	51
a)	Les pigments mélaniques.....	51
b)	Voies biochimiques de synthèse des eumélanines et phaeomélanines.....	51
B-	Biogenèse des eumélanosomes	55
a)	Origine des mélanosomes.....	55
b)	Aperçu général des étapes de formation des eumélanosomes	56
c)	Etapes endosomales de la mélanogenèse	57
d)	Stades tardifs : des mécanismes établis grâce à l'étude de maladies génétiques	58
e)	Rôle des protéines Rab dans la biogenèse des mélanosomes.....	62
f)	OA1 : un rôle encore méconnu.....	64
C-	Transport des mélanosomes au sein du mélanocyte.....	65
a)	Déplacement des mélanosomes le long du cytosquelette	65
b)	Mise en évidence des éléments clés dans le transport des mélanosomes grâce aux mutants de couleur	66
c)	Le complexe RAB27a/MLPH/Myosin Va	67
d)	RAB27A-RAB3GEP-RGGT	68
e)	Le syndrome de Chediak-Higashi et la protéine LYST	69
f)	Transport rétrograde des mélanosomes le long des microtubules.....	69
g)	Etude détaillée du locus <i>dilute suppressor (dsu)</i> et du gène <i>MREG</i>	70
D-	Transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes	76
a)	Mécanismes de transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes.....	76
b)	Molécules impliquées dans le transfert des mélanosomes	80
III-	REGULATION DE LA MELANOCYTOGENESE ET DE LA MELANOGENESE.....	83
a)	Régulation génétique.....	83
a)	Vue d'ensemble de la régulation génétique de la mélanocytogenèse et de la mélanogenèse.....	83
b)	Le facteur de transcription MITF : protéine centrale de la cascade régulatrice de la pigmentation.....	87
c)	Régulation par les voies de signalisation impliquant les récepteurs c- Kit et EDNRB	91
b)	Régulation par des facteurs paracrines	91
a)	Les dérivés de la proopiomélanocortine : rôle central de l' α MSH	91
b)	La protéine agouti	94
c)	DKK1/NRG1.....	94
d)	Autres facteurs.....	94
c)	Régulation par les UV	95

a) Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mélanogenèse induite par les UV.....	95
b) Implication de la protéine p38 et du facteur de transcription USF-1.....	96
c) Rôle de la protéine suppresseur de tumeur p53.....	97
d) Régulation par le pH	97
a) Les ATPases vacuolaires.....	97
b) Famille des SLC : implication de NCKX5, MATP/SLC452A, et de la protéine P.....	98
IV- BILAN DES GENES IMPLIQUES DANS LA MELANOCYTOGENESE ET LA MELANOGENESE CHEZ LA SOURIS	100

TROISIEME PARTIE : Etude expérimentale des couleurs caramel et abricot chez le chat

I- ETUDE DU MODE DE TRANSMISSION DES COULEURS CARAMEL ET ABRICOT	105
A- Modes de transmission	105
a) Généralités.....	105
b) Mode autosomique dominant	106
c) Mode autosomique récessif	106
d) Proportions d'individus caramel et abricot obtenus à l'issue de divers croisements.....	107
B- Matériel et méthodes	108
C- Résultats.....	110
a) De la difficulté d'utiliser les informations recueillies et la base de données Pawpeds.....	110
b) Recherche du mode de transmission.....	112
c) Recherche d'un ancêtre commun aux chats caramel et abricot	119
II- RECHERCHE DU SUPPORT GENETIQUE DES COULEURS CARAMEL ET ABRICOT	123
A- Démarche scientifique suivie	123
B- Matériel et méthodes	123
a) Animaux.....	123
b) Prélèvements	124
c) Bases de données et logiciels	124
d) Extraction du matériel génétique	125
e) Amplification par PCR	125
f) Séquençage.....	128
g) Génotypage par pyroséquençage	128
C- Résultats.....	128
a) Détermination de la séquence du gène de la mélanoréguline chez le chat.....	128
b) PCR	132
c) Résultats du séquençage.....	133
d) Résultats du génotypage par pyroséquençage	137
III- CARACTERISATION A LA LOUPE BINOCULAIRE ET EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE POILS CARAMEL ET ABRICOT	141
A- Matériel et méthodes	141
a) Echantillons utilisés.....	141

b) Préparation des poils pour l'observation à la loupe binoculaire	141
c) Préparation des poils pour l'observation au microscope électronique à transmission.....	141
B- Résultats.....	142
a) Résultat des observations à la loupe binoculaire.....	142
b) Résultat des observations en microscopie électronique à transmission	148
DISCUSSION	155
CONCLUSION	159
ANNEXES	161
BIBLIOGRAPHIE	189

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Chats noir, chocolat et cannelle (cinnamon) et couleurs de leurs coussinets, d'après Brisson (2012)	18
<u>Figure 2</u> : Poils de chats non agouti et agouti, d'après Brisson (1989)	19
<u>Figure 3</u> : Chat norvégien noir ambre tabby et blanc, d'après Brisson (2012)	19
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique d'un poil de chat roux, adapté d'après Brisson (2012)	20
<u>Figure 5</u> : Photographies d'un chat faon (à gauche), d'un chat lilas (au milieu) et d'un chat bleu (à droite), d'après Brisson (2012)	21
<u>Figure 6</u> : Coussinets plantaires des chats bleu, lilas et faon	21
<u>Figure 7</u> : Représentation schématique des poils chinchilla, silver shaded, silver tabby et smoke	22
<u>Figure 8</u> : Motifs sépia, mink et colourpoint	23
<u>Figure 9</u> : Schématisation des patrons tabbies, d'après Brisson (1989)	24
<u>Figure 10</u> : Sacré de Birmanie caramel sur base bleue.	32
<u>Figure 11</u> : Oriental caramel tabby spotted sur base bleue.	33
<u>Figure 12</u> : Tonkinois caramel point sur base bleu.	34
<u>Figure 13</u> : Siamois caramel point sur base lilas.	35
<u>Figure 14</u> : Sacré de Birmanie caramel tabby point sur base lilas.	35
<u>Figure 15</u> : Mandarin caramel ticked tabby sur base faon.	36
<u>Figure 16</u> : Oriental abricot shaded.	36
<u>Figure 17</u> : Tonkinois abricot point.	37
<u>Figure 18</u> : Siamois abricot point.	38
<u>Figure 19</u> : Oriental abricot.	39
<u>Figure 20</u> : Devenir des mélanocytes issus de la crête neurale, d'après Boissy et Nordlung (1997)	41
<u>Figure 21</u> : Représentation des voies de migration des cellules de la crête neurale au niveau troncal, d'après Dulac (1993)	42
<u>Figure 22</u> : Interactions épithélio-mésenchymateuses pendant le développement du follicule pileux, d'après Aubin-Houzelstein (1997)	43
<u>Figure 23</u> : Formation d'un follicule pileux, d'après Aubin-Houzelstein (1997)	44
<u>Figure 24</u> : Colonisation du follicule pileux en formation par les mélanoblastes et mélanocytes, d'après Hirobe (1995)	44
<u>Figure 25</u> : Vue au microscope électronique de mélanosomes de souris de stades II, III et IV, d'après Schiaffino (2010).	45
<u>Figure 26</u> : Schéma d'un mélanocyte de l'épiderme, d'après Fargeas (1995)	46
<u>Figure 27</u> : Localisation du mélanocyte dans la peau, d'après Eurell et Frappier (2006)	47
<u>Figure 28</u> : conformation d'un poil de mammifère, d'après Sautet (1995)	48
<u>Figure 29</u> : Structure d'un follicule pileux de mammifère, d'après Eurell et Frappier (2006)	49

<u>Figure 30</u> : Cycle du follicule pileux, d'après Eurell et Frappier (2006)	50
<u>Figure 31</u> : Place des enzymes tyrosinase, TYRP1 et DCT dans la chaîne de synthèse des mélanines	52
<u>Figure 32</u> : Etapes de synthèse des mélanines, d'après Kondo et Hearing (2011) ..	53
<u>Figure 33</u> : Mélanocytes en microscopie optique et mélanosomes en microscopie électronique, d'après Delevoye <i>et al.</i> (2011)	56
<u>Figure 34</u> : La voie d'endocytose et la biogenèse des eumélanosomes, issu de Delevoye <i>et al.</i> (2011)	57
<u>Figure 35</u> : PMEL17, composant des fibres des prémélanosomes, d'après Hurbain <i>et al.</i> (2008)	57
<u>Figure 36</u> : Protéines mutées dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS), d'après Raposo et Marks (2007)	59
<u>Figure 37</u> : Spécialisation du trafic intracellulaire dans le mélanocyte, d'après Delevoye <i>et al.</i> (2011)	61
<u>Figure 38</u> : Représentation des interactions des protéines RAB au cours de la biogenèse des mélanosomes et lors de la formation des dendrites, d'après Ohbayashi et Fukuda (2012a)	63
<u>Figure 39</u> : Représentation schématique du complexe RAB27a/Mlph/MyosinVa, d'après Steingrimsson <i>et al.</i> (2006)	67
<u>Figure 40</u> : Protéines RAB régulant le transport des mélanosomes le long des microtubules, d'après Ohbayashi et Fukuda (2012a)	68
<u>Figure 41</u> : Souris <i>ashen</i> (a), <i>ashen/dilute</i> (b), <i>dilute</i> (c), <i>ashen/dilute/dilute suppressor</i> (d) et <i>dilute/dilute suppressor</i> (e)	71
<u>Figure 42</u> : Poils de souris sauvage, <i>dsu</i> , <i>dilute</i> , et <i>dilute/dsu</i> en microscopie électronique, d'après O' Sullivan <i>et al.</i> (2004)	73
<u>Figure 43</u> : Répartition des mélanosomes au sein des mélanocytes chez des souris sauvages, des souris <i>dilute</i> et des souris <i>dilute/dsu</i> , images en microscopie, extrait de Wu <i>et al.</i> (2012)	75
<u>Figure 44</u> : Répartition des mélanosomes au sein d'une unité de pigmentation, extrait de Wu <i>et al.</i> (2012)	75
<u>Figure 45</u> : Mécanismes supposés de transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes, d'après Ando <i>et al.</i> (2011)	77
<u>Figure 46</u> : Le mécanisme de cytophagocytose, d'après Van den Bossche (2006) .	79
<u>Figure 47</u> : La synapse pigmentaire, d'après Van den Bossche (2006)	81
<u>Figure 48</u> : Le promoteur de MITF, d'après Lin et Fisher (2007)	90
<u>Figure 49</u> : Les acteurs de la régulation de la mélanogenèse, d'après Kondo et Hearing (2011)	93
<u>Figure 50</u> : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mélanogenèse induite par les rayons UV, d'après Nissan X (2010)	96
<u>Figure 51</u> : Les protéines mélanosomales et les albinismes oculo-cutanés, d'après Delevoye <i>et al.</i> (2011)	98
<u>Figure 52</u> : Bilan sur les principales molécules intervenant au cours de la mélanogenèse, du transport et du transfert des mélanosomes aux kératinocytes, d'après Wasmeier <i>et al.</i> (2008)	100

<u>Figure 53</u> : Symbolique utilisée pour la représentation des arbres généalogiques.	109
<u>Figure 54</u> : Pedigree de Scintasilva Sue, d'après Pawpeds	110
<u>Figure 55</u> : Antécédents de Tolemac Franvalle Folly dans la base de données Tonkinois, d'après Pawpeds	111
<u>Figure 56</u> : Descendance de Tolemac Franvalle Folly dans la base de données Tonkinois, d'après Pawpeds	111
<u>Figure 57</u> : Pedigree et progéniture de Tolemac Franvalle Folly dans la base de données Siamois, d'après Pawpeds.....	112
<u>Figure 58</u> : Descendance d'une chatte Sacré de Birmanie ayant donné le jour à deux femelles caramelles.	113
<u>Figure 59</u> : Arbre généalogique sur 5 générations de chats de race Balinais.....	114
<u>Figure 60</u> : Arbre généalogique de chats de race Tonkinois sur 9 générations.....	115
<u>Figure 61</u> : Arbre généalogique d'un Oriental shorthair abricot.	117
<u>Figure 62</u> : Mise en évidence d'une parenté sur l'arbre généalogique de trois Siamois provenant d'élevages différents en Europe.....	118
<u>Figure 63</u> : Descendance partielle de Scintasilva Sue.....	120
<u>Figure 64</u> : Détails de l'arbre généalogique d'une partie de la descendance de Scintasilva Sue.	121
<u>Figure 65</u> : Séquence nucléotidique disponible dans la base de données Ensembl pour le gène de la mélanoréguline chez le chat.....	128
<u>Figure 66</u> : Comparaison de la séquence protéique de la mélanoréguline (<i>MREG</i>) chez le chat, la souris, l'humain et le chimpanzé.....	130
<u>Figure 67</u> : Séquence nucléotidique du gène de la mélanoréguline chez le chat après réannotation, d'après Ensembl.	131
<u>Figure 68</u> : Photographie du gel d'agarose après migration des fragments d'ADN par électrophorèse pour 4 chats et 4 SNP.	132
<u>Figure 69</u> : Extrait de l'alignement des séquences des exons de <i>MREG</i> et mise en évidence de 4 SNPs.....	134
<u>Figure 70</u> : Extrait des résultats de génotypage par pyroséquençage pour le SNP2.	137
<u>Figure 71</u> : Poil noir observé à la loupe binoculaire X11,25.....	142
<u>Figure 72</u> : Poils bleus observés à la loupe binoculaire X11,25.....	143
<u>Figure 73</u> : Poils caramel observés à la loupe binoculaire X11,25.	145
<u>Figure 74</u> : Poil roux observé à la loupe binoculaire X11,25.....	146
<u>Figure 75</u> : Poil crème observé à la loupe binoculaire X11,25.....	147
<u>Figure 76</u> : Poil abricot observé à la loupe binoculaire X11,25.....	147
<u>Figure 77</u> : Coupe transversale de poil de chat bleu, vue générale.....	148
<u>Figure 78</u> : Détail sur la jonction médullaire-cortex du poil bleu, coupe transversale.	149
<u>Figure 79</u> : Coupe transversale de médullaire de poil bleu, détail sur les macromélanosomes.....	149
<u>Figure 80</u> : Macromélanosomes à la jonction médullaire/cortex d'un poil bleu, coupe transversale.	150
<u>Figure 81</u> : Jonction cortex-cuticule d'un poil bleu, coupe transversale.....	150

<u>Figure 82</u> : Vue générale en coupe transversale de poil caramel.....	151
<u>Figure 83</u> : Jonction médullaire-cortex en coupe transversale de poil caramel	152
<u>Figure 84</u> : Jonction cortex-cuticule d'un poil caramel, coupe transversale.....	152
<u>Figure 85</u> : Détail de la cuticule d'un poil caramel, coupe transversale.	153

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Combinaisons de couleurs possibles avec les allèles Dm et dm chez des individus non roux.....	26
<u>Tableau 2</u> : Combinaisons de couleurs possibles avec les allèles Dm et dm chez des individus roux.....	27
<u>Tableau 3</u> : Pays reconnaissant le caramel et l'abricot dans le monde et races dans lesquelles le caramel et l'abricot sont acceptés.	29
<u>Tableau 4</u> : Description des robes caramel et abricot et de la couleur des coussinets.....	30
<u>Tableau 5</u> : Maladies génétiques caractérisées par des défauts de pigmentation liés à un transport ou un transfert des mélanosomes défectueux, d'après Van den Bossche <i>et al.</i> (2006).....	66
<u>Tableau 6</u> : Effet de dsu sur la couleur de robe et des yeux de 17 souris mutants de couleur, d'après Moore <i>et al.</i> (1990).....	71
<u>Tableau 7</u> : Principaux gènes intervenant dans la mélanocyto-genèse à l'origine de mutations de la couleur des robes chez les mammifères, Reissmann et Ludwig (2013).....	86
<u>Tableau 8</u> : Gènes de souris clonés intervenant au cours de la mélanocyto-genèse, d'après Bennett et Lamoreux (2003).....	103
<u>Tableau 9</u> : Loci de souris non clonés, à rôle supposé lors de la mélanocyto-genèse, d'après Bennett et Lamoreux (2003).....	104
<u>Tableau 10</u> : Proportions théoriques d'individus caramel et abricot attendus dans diverses configurations de croisements selon que le mode de transmission soit dominant à pénétrance complète ou récessif.....	107
<u>Tableau 11</u> : Chats recrutés pour l'étude.....	108
<u>Tableau 12</u> : Chats utilisés pour le séquençage du gène de la mélanoréguline.	124
<u>Tableau 13</u> : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des exons du gène MREG félin.....	126
<u>Tableau 14</u> : Amorces utilisées pour le génotypage par pyroséquençage	126
<u>Tableau 15</u> : Réactifs utilisés pour les PCR.....	127
<u>Tableau 16</u> : Programmes de PCR utilisés.....	127
<u>Tableau 17</u> : Résultats du génotypage par pyroséquençage pour les SNP1, SNP2, SNP3 et SNP4 situés dans le gène MREG.	138

LISTE DES ANNEXES

<u>Annexe 1</u> : Races reconnues par l' ACF et couleurs autorisées dans ces races.....	162
<u>Annexe 2</u> : Standards des robes caramel et abricot pour le SACC	167
<u>Annexe 3</u> : Standards des robes caramel et abricot chez les Siamois et Balinais pour le GCCF	173
<u>Annexe 4</u> : Document destiné aux éleveurs concernant l'étude	176
<u>Annexe 5</u> : Protocole d'extraction d' ADN à partir de brossettes buccales du Maxwell® 16 Buccal Swab LV DNA Purification Kit.....	178
<u>Annexe 6</u> : Séquence de <i>MREG</i> réannotée avec surlignement des amorces pour le séquençage moléculaire et mise en évidence des SNPs	187

LISTE DES ABREVIATIONS

ABD : *Actin Binding Domain*
ACF : *Australian Cat Federation*
AMPc : *Cyclic Adénosine Mono-Phosphate*
AP-3(I-1) : *Adaptator Protein-3(I-1)*
ASP(=ASIP) : *Agouti Signaling Protein*
BEACH : *BEige And CHediak*
bFGF : *Basic Fibroblast Growth Factor*
BLOC : *Biogenesis of Lysosome related Organelles Complex*
CD (5SCD et 2SCD) : *CystéinyIDOPA*
CDC42 : *Cell Division Control protein 42*
CD-quinones : *CystéinyIDOPA-quinones*
CRE : *cAMP Response Element*
CREB : *cAMP Response Element Binding protein*
DCT (=TYRP2) : *DOPAchrome Tautomérase*
DHI : *5,6-dihydroxyindole*
DHICA : *Acide 5,6-dihydroxyindolecarboxylique*
DKK1 : *DicKKopf-related protein 1*
DOPA : *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*
DOPAchrome : *L-3,4-dihydroxyphenylalaninechrome*
DQ : *Dopaquinone*
DRO : *DéRivés actifs de l' Oxygène*
DSU : *Dilute Suppressor*
EDNRB : *EnDotheliN Receptor type B*
EGF : *Epidermal Growth Factor*
ET3 : *EndoThéline 3*
FGF5 : *Fibroblast Growth Factor 5*
GCCF : *Governing Council of the Cat Fancy*
GPCR : *G Protein Coupled Receptor*
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
HOPS : *Homotypic Protein Sorting*
HPS : *Hermansky-Pudlak Syndrome*
IRF4 : *Interferon Regulatory Factor 4*
KGFR : *Keratinocyte growth factor receptor*
KIT : *Tyrosine-protein Kinase kit*
L.O.O.F : *Livre Officiel des Origines Félines*
LEF : *Lymphoid Enhancer Factor*
LRO : *Lysosome-Related Organelles*
LYST : *LYSosomal Trafficking regulator*
MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinases*
MATP(=SLC45A2) : *Membrane-Associated Transporter Protein*

MBD : *MyosinVa Binding Domain*
MC1R : *Melanocortin 1 Receptor*
MGF (=SCF) : *Mast Cell Growth Factor*
MITF : *Microphthalmia associated Transcription Factor*
MLPH : *Mélanophiline*
MREG : *Melanoregulin*
NCC : *Nordic Cat Club*
NGF : *Nerve Growth Factor*
NRG1 : *NeuRoGéguline 1*
OA1(=GPR143) : *Ocular Albinism 1*
OCA : *Albinisme oculo-cutané*
PAR : *Protease-Activated Receptor*
PAX3 : *PAired boX gene 3*
PKA : *Protéine Kinase A*
POMC : *ProOpioMélanoCortine*
QI : *Orthoquinonimine*
RAB : *Ras-related proteins in brain*
Rac : *Ras activation*
RGGT II : *RAB GeranylGeranyl Transferase II*
Rho : *Ras homologous*
RIEX : *Registre d' Inscription Expérimental*
RILP : *Rab Interacting Lysosomal Protein*
SACC : *Southern African Cat Council*
SCF (=MGF) : *Stem Cell growth Factor*
SHD : *Slp Homology Domain*
SLC : *SoLute Carriers*
Slp2-a : *Synaptotagmine-like protein 2-a*
SNAP : *Synaptosomal-Associated Protein*
SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*
SOX10 : *SRY-bOX containing gene 10*
TDE : *Tyrosinase Distal Element*
TPCN2 : *Two-Pore segment ChaNnel 2*
TYR : *Tyrosinase*
TYRP1 : *Tyrosinase-Related-Protein-1*
TYRP2 (=DCT) : *Tyrosinase-Related-Protein-2*
USF-1 : *Upstream transcription Factor 1*
VAMP : *Vesicle Associated Membrane Protein*
VARP (=ANKR27) : *VPS9-Ankyrin Repeat Protein*
V-ATPase : *ATPase vacuolaire*
VID : *VAMP-7 Interaction Domain*
VPS9 : *Vacuolar sorting protein 9*
WS : *Waardenburg Syndrome*
αMSH : *α Melanocyte Stimulating Hormone*

INTRODUCTION

Les couleurs caramel et abricot constituent un mystère et un objet de débat pour le monde de la félinotechnie depuis plusieurs décennies. Apparues officiellement dans les années 1970 en Grande Bretagne chez des chats de race Oriental, elles résultent de la modification des couleurs diluées bleu, lilas et faon qui sont transformées en caramel et du crème qui est transformé en abricot. Si ces couleurs font l'objet d'un débat houleux parmi toutes les fédérations félines mondiales, c'est que leur existence en elle-même reste très controversée. D'après certaines théories, elles ne seraient qu'une facette de la variabilité de l'expression des couleurs diluées sous l'influence des polygènes. Pour d'autres, les reflets métalliques teintés de miel observés chez ces chats suffisent à justifier leur existence et à les distinguer du bleu, du lilas, du faon et du crème. Cependant, aucune preuve scientifique n'a pu être apportée à ce jour concernant l'existence d'une mutation responsable du caramel et de l'abricot. Dans certaines fédérations comme le *Governing Council of the Cat Fancy* (G.C.C.F) en Grande Bretagne ou l'*Australian Cat Federation* (A.C.F) en Australie, ces couleurs sont reconnues officiellement. Cette reconnaissance a interpellé des éleveurs félines européens qui ont progressivement envisagé d'avoir des chatons caramel et abricot dans leurs élevages. Cette thèse a ainsi vu le jour suite à l'impulsion d'une éleveuse française de Sacré de Birmanie nous ayant contacté, pensant avoir de tels chats dans ses portées. Suite à cela, le Livre Officiel des Origines Félines (L.O.O.F) nous a apporté son soutien financier afin que nous puissions vérifier s'il y avait effectivement un déterminisme génétique prouvant l'existence du caramel et de l'abricot.

Dans une première partie de ce manuscrit, après un rappel sur les couleurs et les motifs de robe chez le chat, l'histoire des couleurs caramel et abricot ainsi qu'un descriptif de ces couleurs et des illustrations seront présentés. La deuxième partie est constituée par l'étude bibliographique des mécanismes de la mélanogenèse et de son déterminisme génétique, préalable indispensable à la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques qui pourraient sous-tendre les couleurs caramel et abricot. Enfin, dans une troisième partie est exposé notre travail de recherche, divisé en trois axes principaux. Tout d'abord la mise en évidence d'un mode de transmission des couleurs caramel et abricot. Puis sera développé l'étude de génétique moléculaire dont le but principal était de tester la candidature, pour la mutation à l'origine des couleurs caramel et abricot, du locus *dilute suppressor*, homologue d'une mutation murine qui assombrit la couleur des souris diluées. Enfin, nous présenterons les résultats de l'observation de poils de chats caramel et abricot à la loupe binoculaire et en microscopie électronique à transmission. Enfin nous discuterons de nos résultats et proposerons des pistes pour approfondir ce travail de recherche.

PREMIERE PARTIE

Histoire des couleurs caramel et abricot chez le chat

I- Les couleurs et motifs de robes chez le chat : description et déterminismes génétiques

A- Les couleurs

Il existe actuellement une cinquantaine de races reconnues en France qui sont le fruit d'efforts de sélection et de croisements effectués depuis environ 150 ans. Les caractères retenus pour créer les races félines modernes sont essentiellement morphologiques : longueur, texture et couleur du pelage, taille et forme de la tête, de la queue et des oreilles. Le déterminisme de la couleur et de la texture de la robe chez le chat a suscité l'intérêt des vétérinaires félinotechniciens, des éleveurs et des généticiens depuis la récente multiplication des races félines. Si le mode de transmission d'un certain nombre de couleurs et de patrons est connu depuis de nombreuses années, leur déterminisme moléculaire n'a été élucidé que durant cette dernière décennie. Les récents progrès de la génétique féline ont permis d'identifier les gènes et les mutations gouvernant certains phénotypes. La découverte des mutations déterminant les couleurs et textures de robe félines a conduit au développement de tests génétiques qui aident les éleveurs à planifier les accouplements de leurs reproducteurs. En France, ces tests sont disponibles auprès des laboratoires Antagene (www.antagene.com), Genindexe (www.genindexe.com) et le laboratoire vétérinaire départemental du Rhône pour la couleur Ambre (www.vetagro-sup.fr/lvd).

a) Couleurs de base de la robe

La couleur de la robe est déterminée par deux types de pigments : les eumélanines, brunes à noires, et les phéomélanines, jaunes à rouges. Une description détaillée des mécanismes moléculaires de la pigmentation de la peau et des poils est présentée dans la seconde partie de ce document.

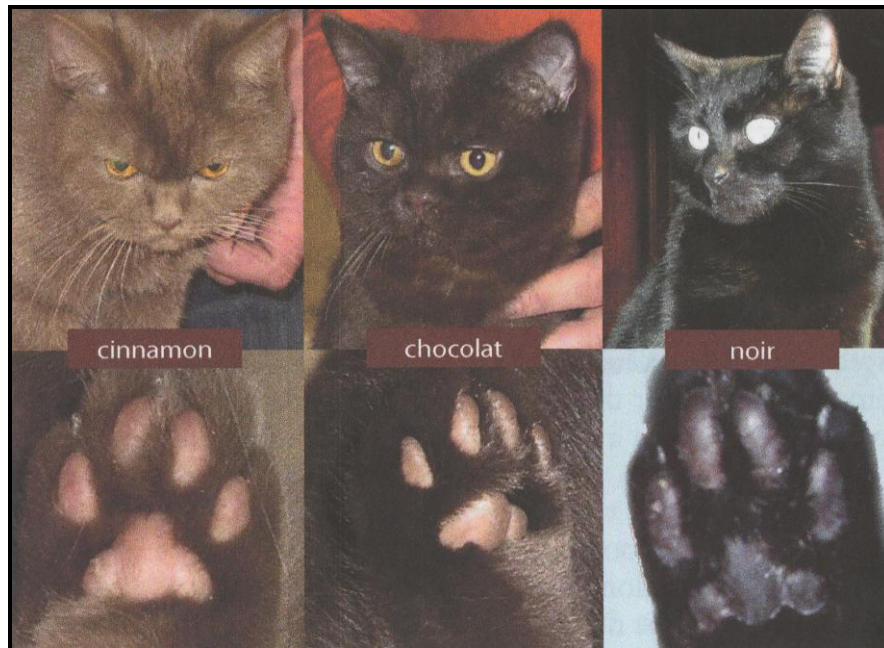
a.1) Couleurs des eumélanines

La couleur des eumélanines, noires ou brunes, est déterminée par le locus *B* (*Brown*). La couleur marron, dite chocolat, déterminée par l'allèle *b* (*brown*) est récessive par rapport à la couleur noire déterminée par l'allèle *B* (*black*). L'allèle *b'* (*brown light*), responsable de la couleur cannelle (*cinnamon*), est récessif par rapport aux allèles *b* et *B*. Ainsi, l'ordre de dominance des trois allèles au locus *B* est $B > b > b'$.

Le gène en cause, appelé *TYRP1* (*tyrosinase related protein 1*), ainsi que les trois allèles ont été identifiés par Schmidt-Kündzel *et al.* (2005).

La couleur de base d'un chat est visible au niveau des coussinets si le chat n'a pas les pieds blancs. Chez le chat noir, les coussinets plantaires sont noirs à violets foncés, chez le chat chocolat ils sont bruns rosés et chez le chat cannelle ils sont rose orangés (figure 1).

Figure 1 : Chats noir, chocolat et cannelle (cinnamon) et couleurs de leurs coussinets, d'après Brisson (2012)



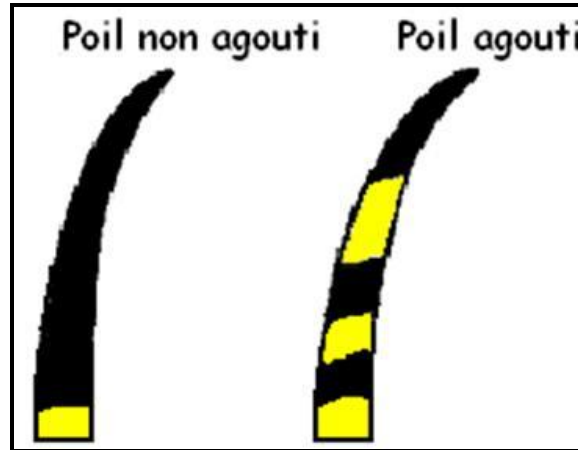
a.2) Proportions eumélanines/phaeomélanines

Les proportions relatives des eumélanines et des phaeomélanines dans le pelage du chat domestique sont déterminées par trois locus: *A* (*Agouti*), *E* (*Extension*) et *O* (*Orange*).

➤ *Locus Agouti*

Le locus *Agouti* (*A*) contient le gène *ASIP* (*agouti signal peptide*) identifié en 2003 chez le chat (Eizirik *et al.*, 2003). L'allèle *A* (*agouti*), dominant, gouverne la présence de poils agoutis dans le pelage alors que l'allèle *a* (*non-agouti*), récessif, est responsable de l'absence de poils agoutis : tous les poils sont uniformément pigmentés (figure 2). La présence de poils agoutis permet l'expression du patron tabby chez le chat, qui peut être de quatre types : tiqueté, tigré, classique ou tacheté. Ainsi, la nomenclature qui est utilisée en élevage félin comporte une source de confusion : les éleveurs désignent par tabby un chat qui en réalité est agouti et par uni un chat non-agouti. Le locus *Tabby*, qui participe au type de patron tabby, est différent du locus *Agouti*.

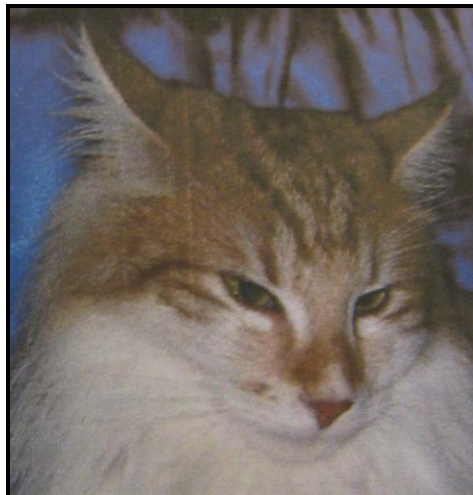
Figure 2 : Poils de chats non agouti et agouti, d'après Brisson (1989)



➤ *Locus Extension*

Au locus *Extension* (*E*) est situé le gène *MC1R* (*melanocortin 1 receptor*) identifié en 2003 (Eizirik *et al.*, 2003). L'allèle *e*, responsable de la couleur ambre chez le chat de race Norvégien et caractérisé par une disparition progressive des eumélanines donnant une couleur fauve clair, a été identifié du point de vue moléculaire en 2009 (Peterschmitt *et al.*, 2009). Il est récessif par rapport à l'allèle *E* qui permet une production stable d'eumélanines au cours de la vie du chat. La particularité de la couleur ambre est que la diminution de la proportion des eumélanines dans le pelage est progressive. Les chatons naissent avec une pigmentation non ambre puis la couleur ambre apparaît progressivement au cours de leur vie, pour se stabiliser à l'âge adulte (figure 3).

Figure 3 : Chat norvégien noir ambre tabby et blanc, d'après Brisson (2012)

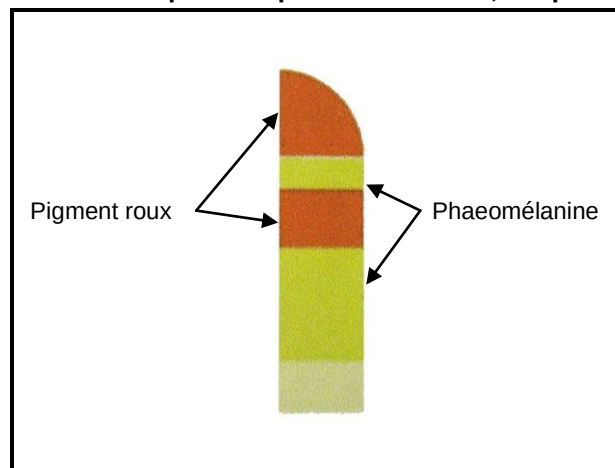


➤ *Locus Orange*

La couleur rousse chez le chat domestique est liée au sexe. Le locus *O*, possède deux allèles, l'allèle *O* (orange) qui gouverne la présence de la couleur rousse et l'allèle *o* (non-orange) qui est responsable de l'absence de la couleur rousse. Les allèles *O* et *o* n'ont pas été identifiés à l'échelle moléculaire, mais le locus *O* a été

cartographié sur le chromosome X (Schmidt-Kündzel *et al.*, 2009). Ainsi, mâles (X_OY) et femelles (X_OX_O) peuvent être roux, ou non-roux (X_OY et X_OX_O respectivement), mais seules les femelles peuvent présenter à la fois des poils roux et des poils non-roux (X_OX_O) et donc arborer la couleur écaille de tortue. Ce patron constitué de plages rousses et de plages non rousses résulte du phénomène d'inactivation alterne de l' X . Lors du développement embryonnaire précoce, chez la femelle des mammifères, l'un des deux chromosomes X de la cellule est éteint du point de vue de la transcription (Morey et Avner, 2011), il est dit inactivé. Si dans une cellule d'un embryon femelle X_OX_O , le chromosome X portant l'allèle O est inactivé, les cellules filles descendantes de cette cellule embryonnaire porteront également un chromosome X avec l'allèle O qui est inactivé et si ces dernières sont des mélanocytes de la peau, il en résultera une plage de poils non roux, l'allèle o du chromosome X actif étant le seul à s'exprimer. De plus, le roux est épistatique sur l'uni (non-agouti), les poils roux présentant toujours une bande de mélanines claires intercalée entre deux bandes de mélanines foncées (figure 4). Il n'existe donc pas de chat roux uni. Les coussinets plantaires des chats roux sont roses.

Figure 4 : Représentation schématique d'un poil de chat roux, adapté d'après Brisson (2012)



a.3) Absence de pigmentation

La robe dite blanc dominant est caractérisée par une absence de pigmentation du pelage à l'âge adulte, mais la présence d'une pigmentation de l'œil. Les chats uniformément blancs peuvent présenter des yeux bleus, des yeux or à verts ou des yeux vairons. En effet l'absence de pigmentation de l'œil chez le chat ne se traduit pas par une couleur rouge des yeux, comme chez de nombreux mammifères albinos, mais par une couleur bleue très pâle (Imes *et al.*, 2006). La couleur blanche dominante est gouvernée par le locus W (*White*) qui possède deux allèles, W (white) dominant qui détermine le blanc et w récessif, l'allèle sauvage qui permet la pigmentation. A ce jour, le locus n'a pas été caractérisé à l'échelle moléculaire. Le blanc dominant est connu depuis longtemps pour être associé, chez certains chats, à une surdité congénitale incurable qui peut être unilatérale ou bilatérale (Bergsma et Brown, 1971).

b) Modification de la couleur de base

b.1) Dilution

La couleur de base peut être diluée par l'action du locus *Dilution* (*D*) qui comporte deux allèles. L'allèle *D*, dominant, est l'allèle sauvage (non-dilution du pelage) et l'allèle *d*, récessif, est responsable de la dilution. Seuls les chats homozygotes *d/d* sont donc dilués. Le gène *MLPH*, codant la mélanophiline et situé au locus *D*, a été identifié en 2006 chez le chat et l'allèle *d* a été caractérisé (Ishida *et al.*, 2006). Le noir est dilué en bleu, le chocolat en lilas, le cannelle en faon et le roux en crème (figure 5).

Figure 5 : Photographies d'un chat faon (à gauche), d'un chat lilas (au milieu) et d'un chat bleu (à droite), d'après Brisson (2012)



Chez un chat bleu, les coussinets plantaires sont gris bleus alors qu'ils sont roses vifs chez un chat lilas et roses pâles chez un chat faon (figure 6). Chez un chat crème ils sont roses très pâles.

Figure 6 : Coussinets plantaires des chats bleu, lilas et faon



d'après <http://chat.alysebrisson.net/couleurs.html>

Les modifications de la dilution présentes chez les chats caramel et abricot sont étudiées par la suite dans le chapitre I-D.

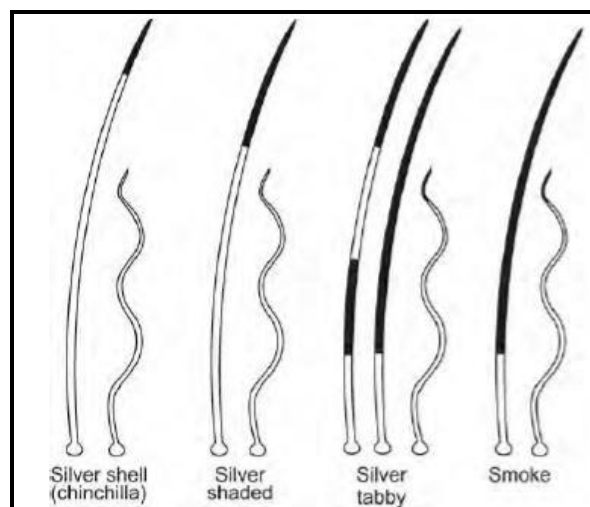
b.2) Silver et smoke

Le locus *Silver* possède deux allèles. L'allèle *I* (*inhibitor*), dominant, est responsable d'une suppression de la pigmentation du poil dans les zones phaeomélaniques. Il semble sans effet sur les eumélanines. L'allèle *i*, récessif, est l'allèle sauvage. Le locus *Silver* a été cartographié chez le chat, mais le gène en cause et les allèles *I* et *i* restent inconnus (Menotti-Raymond *et al.*, 2009). Chez le chat uni (non-agouti), l'inhibition de la couleur par l'allèle *I* se traduit par un blanchiment de la base du poil, habituellement grise. La robe est dite fumée (smoke). Chez le chat tabby (agouti), l'action de *I* se traduit par un blanchiment de la base du poil et de la bande de phaeomélanines. Le chat est dit silver tabby. Une représentation schématique des poils silver tabby et smoke est visible à la figure 7.

b.3) Shaded et chinchilla

Chez les chats tabbies (agoutis), la bande de phaeomélanines du poil peut être étendue par l'action d'un locus appelé *Wide band* (*Wb*). A ce locus, ont été décrits deux allèles, même si une controverse existe concernant le caractère réellement monogénique de « Wide band ». Sous l'hypothèse d'un déterminisme monogénique, l'allèle *Wb*, dominant, serait responsable d'un élargissement de la bande de phaeomélanines qui repousserait la pigmentation due aux eumélanines à la pointe du poil. L'allèle *wb* serait l'allèle sauvage. Les chats shaded ont une pigmentation eumélanique allant de un huitième à un quart de la longueur du poil, à son extrémité. Les chats tabbies possédant un (ou deux) allèle(s) *Wb* sont qualifiés de golden shaded, du fait de l'extension de la bande dorée de phaeomélanines. La combinaison de *Wb* et *I* conduit à la couleur silver shaded : la bande de phaeomélanines est élargie et blanchie (figure 7). Le terme chinchilla désigne lui un chat shaded dont l'expression pigmentaire eumélanique est restreinte à un huitième du poil au maximum (figure 7).

Figure 7 : Représentation schématique des poils chinchilla, silver shaded, silver tabby et smoke



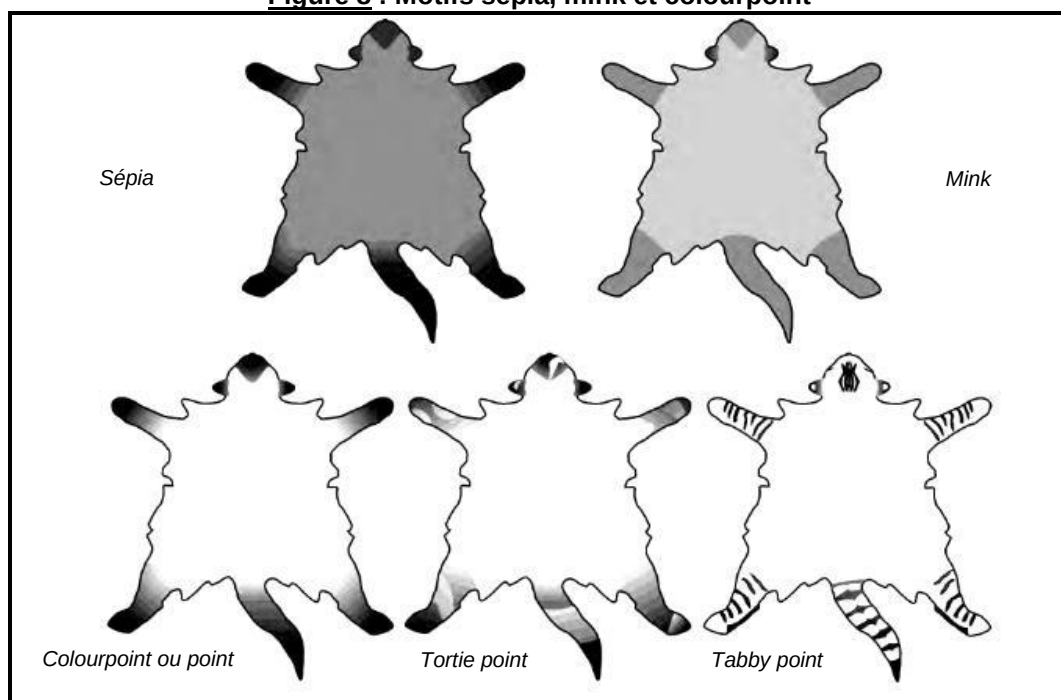
d'après <http://www1.fifeweb.org/dnld/std/GEN-SGA.pdf>

B- Les motifs

a) Colourpoint, sépia et mink

Parmi les patrons de coloration du chat domestique, le patron colourpoint également appelé point, emblématique de la race Siamois, est décrit depuis des décennies. Il est gouverné par un allèle du locus *Colour*, auquel trois autres allèles ont été décrits chez le chat. L'allèle *C*, dominant, est l'allèle sauvage. L'allèle c^s , récessif est responsable du patron colourpoint. L'allèle c^b , récessif, gouverne le patron sépia alors que l'allèle *c*, également récessif, est responsable d'albinisme. Au locus *Colour* est situé le gène *TYR* qui code la tyrosinase (Lyons *et al.*, 2005). Les allèles *C*, c^s , c^b et *c* ont été identifiés d'un point de vue moléculaire et l'ordre de dominance a été déterminé : $C > c^s = c^b > c$ (Lyons *et al.*, 2005; Imes *et al.*, 2006). Les allèles c^s et c^b sont co-dominants. L'allèle *c*, responsable d'albinisme, apparu dans une lignée de Siamois, n'a pas été conservé chez le chat de race en raison de son caractère délétère (Imes *et al.*, 2006). Les chats de génotype c^s/c^s sont qualifiés de colourpoint (ou point) et présentent un contraste important entre les extrémités (oreilles, face, queue, bout des pattes) normalement pigmentés et le reste du corps qui est dépigmenté. Leurs yeux sont d'un bleu intense. Les chats de génotype c^b/c^b sont qualifiés de sépia et présentent un contraste peu marqué entre les extrémités et le reste du corps. Leurs yeux sont or à vert. Les chats de génotype c^s/c^b sont qualifiés de mink et présentent un contraste moyen entre les extrémités et le reste du corps. Leurs yeux sont couleur "aigue-marine" (Lyons *et al.*, 2005). La figure 8 représente les motifs sépia, mink, colourpoint, tortie point et tabby point.

Figure 8 : Motifs sépia, mink et colourpoint

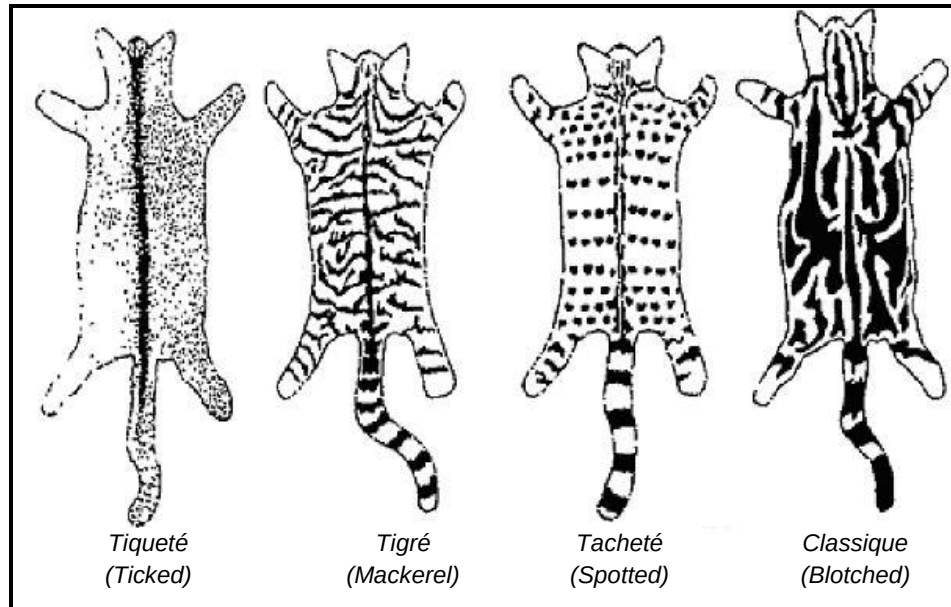


d'après <http://www1.fifeweb.org/dnld/std/GEN-POINTED.pdf>

b) Tabby

Chez les chats qui possèdent des poils agoutis, quatre patrons tabby différents ont été décrits (figure 9): tiqueté (ou ticked), classique également appelé marbré (ou blotched), tigré (ou mackerel) et tacheté (ou spotted).

Figure 9 : Schématisation des patrons tabbies, d'après Brisson (1989)



Les chats de patron tabby tiqueté ont un pelage entièrement constitué de poils agoutis. Cette robe est emblématique de la race Abyssin. Les chats de patron tabby classique présentent des marbrures sombres sur un fond de poils agoutis. Les chats de patron tabby tigré présentent des rayures sombres sur un fond de poils agoutis et les chats de patron tabby tacheté présentent des taches sombres plus ou moins rondes sur un fond de robe agouti (figure 9).

Initialement, la présence d'un unique locus appelé *Tabby* avait été supposée pour expliquer les patrons tiqueté, classique et tigré. Ce locus avait été cartographié sur le chromosome B1 du chat (Lyons *et al.*, 2006). Récemment, l'implication de deux locus épistatiques pour gouverner ces trois patrons a été démontrée (Eizirik *et al.*, 2010). Le locus *Ticked* (*Ti*), situé sur le chromosome B1, comporte deux allèles co-dominants : Ti^A (Abyssin) responsable du patron tiqueté et Ti^+ (sauvage). Les chats de génotype Ti^A/Ti^A présentent un pelage uniformément tiqueté alors que les chats Ti^A/Ti^+ présentent un pelage tiqueté avec des marques rayées sur les membres, la tête et la queue. Le locus *Tabby* (*Ta*), situé sur le chromosome A1, possède deux allèles : Ta^M (mackerel), dominant, qui gouverne le patron tigré et ta^b (blotched), récessif, qui gouverne le patron classique. Les patrons tigré (mackerel) ou classique (blotched) ne peuvent s'exprimer que chez des chats homozygotes Ti^+/Ti^+ au locus *Ticked*. En effet, il y a épistasie de l'allèle Ti^A sur les allèles du locus *Tabby*. Les chats homozygotes ta^b/ta^b sont de patron tabby classique. Les chats de génotype Ta^M/Ta^M et Ta^M/ta^b sont de patron tabby tigré. Le patron tacheté résulterait de la

fragmentation des rayures, chez un chat initialement tigré, sous l'action d'un/de gène(s) modificateur(s) (Eizirik *et al.*, 2010).

c) Marques blanches

c.1)Gants

Certaines races félines sont caractérisées par la présence de gants blancs comme le Sacré de Birmanie, le Ragdoll ou le Snowshoe. Chez le Sacré de Birmanie, une mutation récessive dans le gène *KIT* (*tyrosine-protein kinase kit*) a été identifiée très récemment mais non encore publiée. Cette mutation semble spécifique du Sacré de Birmanie et ne permet pas d'expliquer la présence de gants chez le Ragdoll (www.vgl.ucdavis.edu).

c.2)Panachure

La panachure, ou présence de taches blanches, est expliquée par un locus, cartographié sur le chromosome B1 du chat (Cooper *et al.*, 2006). Ce locus, appelé *S* (*White spotting*), posséderait deux allèles : *S*, dominant, responsable de la présence de taches blanches et *s*, récessif, responsable de l'absence de taches blanches. Le déterminisme de l'étendue des taches reste encore mal compris à ce jour. Il est supposé que les chats sans panachure seraient de génotype *s/s*, les chats bicolores (pelage contenant autant de surface blanche que de surface pigmentée) seraient *S/s* et les chats van (coloration restreinte à la tête et à la queue) seraient *S/S*. Les chats arlequin (blanc envahissant avec la couleur restreinte à la tête, la queue et jusqu'à quatre petites taches colorées) seraient *S/s* ou *S/S*. La présence de gènes modificateurs permettrait d'expliquer les variations phénotypiques entre un chat *S/s* bicolore et un chat *S/s* arlequin.

De nombreux autres patrons et couleurs restent encore inexpliqués chez le chat. Les rosettes du chat Bengal, issu d'une hybridation entre le chat domestique (*Felis catus*) et le chat-léopard (*Prionailurus bengalensis*), ne peuvent pas être expliquées par les locus *Tabby* et *Ticked*. Toujours chez le Bengal, la modification *glitter*, qui rend le poil très brillant, reste mystérieuse. De même, la modification *rufus*, qui intensifie les tons phaeomélaniques, n'est pas caractérisée.

C- Le caramel et l'abricot

Le caramel et l'abricot sont issus des couleurs diluées (bleu, lilas, faon et crème) qui foncent et sont modifiées par l'action d'un locus appelé *Dilute Modifier* (*Dm*). A ce locus a été décrit l'allèle *Dm* (modification de la dilution), pour lequel Patricia Turner a émis l'hypothèse dans les années 1970 qu'il serait dominant sur l'allèle sauvage *dm*, récessif (<http://www.caramelapricotfederation.co.uk/>).

Cette hypothèse se heurte au constat que lorsqu'on étudie le pedigree des chats caramel et abricot, on est confronté tôt ou tard à des incohérences. En effet, deux chats de couleurs diluées sans modification ne devraient pas être capables de

produire des chatons caramel ou abricot. Cependant, ce cas de figure est rencontré et il est alors probable qu'au moins l'un des parents du chaton soit en réalité un chat caramel ou abricot non déclaré comme tel. L'erreur de jugement peut être mise en cause dans les pays où ces couleurs sont reconnues. En effet, les nuances de teintes entre un chat caramel et un chat de robe diluée non modifiée peuvent être subtiles et l'un des principaux critères retenu pour distinguer le caramel et l'abricot est la teinte métallique de ces couleurs à la lumière du jour. Les juges sont donc confrontés à un problème majeur lors des concours : l'éclairage ambiant, souvent peu propice à la mise en valeur de ces reflets. Dans les pays où ces couleurs ne sont pas reconnues, le problème ne se pose pas puisqu'aucun pedigree n'est émis en caramel ou abricot.

Dilute Modifier transforme un chat bleu, faon ou lilas en chat caramel et un chat crème en chat abricot. Le roux, le noir, le chocolat et le cannelle sont épistatiques sur le caramel et l'abricot, ce qui signifie que des chats de l'une de ces couleurs peuvent porter l'allèle *Dm* tout en le masquant pendant plusieurs générations, tant qu'aucun allèle de dilution n'est impliqué.

Les tableaux 1 et 2 précisent les génotypes possibles associés aux phénotypes caramel ou abricot existant.

Tableau 1 : Combinaisons de couleurs possibles avec les allèles *Dm* et *dm* chez des individus non roux

PHENOTYPE	GENOTYPE
Noir	<i>B-,D-,DmDm</i> <u>ou</u> <i>B-,D-,Dmdm</i> <u>ou</u> <i>B-,D-,dmdm</i>
Bleu	<i>B-,dd,dmdm</i>
Caramel sur base bleue	<i>B-,dd,Dmdm</i> <u>ou</u> <i>B-,dd,DmDm</i>
Chocolat	<i>b-,D-,DmDm</i> <u>ou</u> <i>b-,D-,Dmdm</i> <u>ou</u> <i>b-,D-,dmdm</i>
Lilas	<i>b-,dd,dmdm</i>
Caramel sur base lilas	<i>b-,dd,Dmdm</i> <u>ou</u> <i>b-,dd,DmDm</i>
Cinnamon	<i>b^lb^l,D-,DmDm</i> <u>ou</u> <i>b^lb^l,D-,Dmdm</i> <u>ou</u> <i>b^lb^l,D-,dmdm</i>
Fawn	<i>b^lb^l,dd,dmdm</i>
Caramel sur base faon	<i>b^lb^l,dd,Dmdm</i> <u>ou</u> <i>b^lb^l,dd,DmDm</i>

Tableau 2 : Combinaisons de couleurs possibles avec les allèles *Dm* et *dm* chez des individus roux

PHENOTYPE	GENOTYPE
Noir tortie	$B-,XOX_o,D-,DmDm$ <u>ou</u> $B-,XOX_o,D-,Dmdm$ <u>ou</u> $B-,XOX_o,D-,dmdm$
Bleu tortie	$B-,XOX_o,dd,dmdm$
Caramel tortie sur base bleue	$B-,XOX_o,dd,Dmdm$ <u>ou</u> $B-,XOX_o,dd,DmDm$
Chocolat tortie	$b-,XOX_o,D-,DmDm$ <u>ou</u> $b-,XOX_o,D-,Dmdm$ <u>ou</u> $b-,XOX_o,D-,dmdm$
Lilas tortie	$b-,XOX_o,dd,dmdm$
Caramel tortie sur base lilas	$b-,XOX_o,dd,Dmdm$ <u>ou</u> $b-,XOX_o,dd,DmDm$
Cinnamon tortie	$b'b',XOX_o,D-,DmDm$ <u>ou</u> $b'b',XOX_o,D-,Dmdm$ <u>ou</u> $b'b',XOX_o,D-,dmdm$
Faon tortie	$b'b',XOX_o,dd,dmdm$
Caramel tortie sur base faon	$b'b',XOX_o,dd,Dmdm$ <u>ou</u> $b'b',XOX_o,dd,DmDm$
Roux	Quelque soit la couleur de base (noir/chocolat/cinnamon) $XOXOouXOY,D-,DmDm$ <u>ou</u> $XOXOouXOY,D-,Dmdm$ <u>ou</u> $XOXOouXOY,D-,dmdm$
Crème	Quelque soit la couleur de base (noir/chocolat/cinnamon) $XOXOouXOY,dd,dmdm$
Abricot	Quelque soit la couleur de base (noir/chocolat/cinnamon) $XOXOouXOY,dd,Dmdm$ <u>ou</u> $XOXOouXOY,dd,DmDm$

II-Histoire des couleurs caramel et abricot chez le chat

A- Apparition des robes caramel et abricot

Les couleurs caramel et abricot sont l'objet de nombreuses controverses dans la majorité des fédérations félines mondiales. Bien que ces couleurs soient considérées par beaucoup comme de nouvelles couleurs, elles sont en réalité décrites depuis une quarantaine d'années déjà dans certains pays, dont l'un des précurseurs a été le Royaume Uni. S'il est communément admis que les couleurs caramel et abricot ont été initialement observées chez des chats anglais de race Oriental à poils courts, on les retrouve désormais non seulement chez l'Oriental à poils courts mais aussi chez le Siamois, le Balinais (Siamois à poils longs), le Javanais (également appelé Mandarin ou Oriental à poils longs), le Tonkinois, le Burmese, le Sacré de Birmanie et le British pour les races présentes en Europe. La mondialisation n'a pas épargné les couleurs caramel et abricot puisqu'elles sont maintenant signalées - de façon officielle ou officieuse- sur tous les continents, des Etats-Unis à l'Europe en passant par l'Afrique du Sud, l'Australie et la Nouvelle Zélande.

Chez les Orientaux à poils courts, la couleur caramel peut être tracée jusqu' à Scintasilva Sue, une chatte noire silver née dans les années 1960's, qui fut le résultat d' un croisement entre un siamois bleu et une chatte de race persan noire chinchilla importée des Etats Unis vers l'Angleterre pour le programme de développement du silver chez les chats orientaux. L'une de ses filles, Scintilla Serene Sunset fût une chatte enregistrée en noire tortie silver shaded. En 1973, une éleveuse, Patricia Turner, réalisa que Scintilla Serene Sunset avait la capacité de produire des chatons de couleurs étranges. Elle maria Serene Sunset en 1972 à un siamois roux et obtint des chatons abricot. En 1974 et 1975, Serene Sunset fut mariée à deux mâles chocolat et des chatons caramel furent produits. En 1974, Scintilla Dresden Rosa, fille d'un des deux mâles chocolat et de Serene Sunset fût le premier chaton caramel enregistré, bien que la couleur ne soit pas encore officiellement reconnue. L'année suivante, le premier chat abricot fût enregistré en Angleterre (<http://www.caramelapricotfederation.co.uk/>).

D'autres théories ont été avancées quant aux origines du caramel et de l'abricot, mais elles font toutes intervenir initialement des croisements avec des persans chinchillas afin d'introduire le silver dans la race Oriental. Ainsi on peut citer les chats persans chinchillas Kute Kit Silver Flyer, Kute Kit Silver Knick Knack et Silver Mesa Apache, tous trois importés des Etats Unis à la fin des années 1950's vers le Royaume Uni puis l'Australie (Communication personnelle Leysley Morgan Blythe). Quels que soit les chats à l'origine de la mutation *Dm*, il y a de fortes probabilités pour que celle-ci ait été héritée en même temps que le Chinchilla

(<http://www.oriental-cat-breeder.co.uk/caramel-and-apricot-and-cinnamon-and-fawn-article.php>).

B- Reconnaissance des couleurs caramel et abricot dans le monde

a) Situation dans le monde

Très peu de pays reconnaissent officiellement les couleurs caramel et abricot à ce jour. Seules quelques associations félines les reconnaissent dans certaines races (Dickens, 2006) . Les pays et les associations sont listés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Pays reconnaissant le caramel et l' abricot dans le monde et races dans lesquelles le caramel et l'abricot sont acceptés.

Pays (association)	Races où le caramel et l'abricot sont reconnus
Royaume Uni (GCCF*)	Siamois, Balinais, Oriental Longhair, Asian Shorthair, Asian Longhair, Burmilla ,Tiffanie, Snowshoe, Tonkinois shorthair
Allemagne (NCC**)	Siamois, Balinais, Seychellois shorthair, Seychellois longhair.
Afrique du Sud (SACC***)	Reconnus dans toutes les races.
Australie (ACF****)	Siamois, Balinais, Oriental longhair, Australian Mist, Tonkinois, Burmilla, Ragdoll, Sacré de Birmanie, Persan, British. <u>Cf Annexe 1</u>
Nouvelle Zélande (ACF)	Siamois, Balinais, Oriental longhair, Australian Mist, Tonkinois, Burmilla, Ragdoll, Sacré de Birmanie, Persan, British

* GCCF : *Governing Council of the Cat Fancy* ; ** NCC : *Nordic Cat Club* ; *** SACC : *Southern African Cat Council* ; **** ACF : *Australian Cat Federation*

En Belgique, la situation reste ambiguë : les pedigrees avec la couleur caramel sont émis mais ces chats ne sont pas acceptés en concours.

b) Situation en France

Actuellement, en France, ces couleurs ne sont pas reconnues par le L.O.O.F. Cependant, suite à la demande d'un petit pool d'éleveurs français, quelques ajustements ont été effectués:

➤ Auparavant, le pedigree d'un chat dont un des ancêtres était caramel (chat anglais par exemple) était enregistré au « RIEX » (Registre d'Inscription Expérimental). Ce livre annexe contient les chats dont la généalogie ou la race ne

peut leur permettre d'être directement inscrits au livre principal. Désormais, un chat dont un des ancêtres est caramel n'est plus enregistré en « RIEX ».

➤ Les chats caramel entrant en France garderont une mention caramel, par exemple « couleur officielle bleu mention caramel », mais les chats seront jugés en bleu sans mention.

III- Description des robes caramel et abricot

A- Descriptif des robes caramel et abricot

Les robes caramel et abricot sont d'une couleur plus chaude que les couleurs diluées, d'un gris/brun pouvant tendre vers le miel pour les robes caramel. Elles se caractérisent également par le reflet métallique de la couleur, particulièrement visible à la lumière du jour et qui peut être plus discret chez les chatons. Un descriptif plus précis de ces couleurs est disponible dans le tableau 4 où est indiquée une description de chaque couleur de robe mais également la couleur des coussinets, celle-ci étant souvent informative et permettant de faire la différence lorsque cette dernière est peu nette entre un animal de couleur diluée non modifiée et un chat caramel ou abricot. La vitesse de développement des « point » chez les animaux colourpoint est également informative puisque la couleur se développe plus vite chez un chaton caramel que chez un chaton dilué non modifié.

Les **annexes 2 et 3** présentent des extraits des standards établis par la SACC (*Southern African Cat Council*) et par la GCCF (*Governing Council of the Cat Fancy*) où chaque type de robe est décrit. Pour l'annexe 3, seules les couleurs chez le Siamois et le Balinais sont disponibles.

Tableau 4 : Description des robes caramel et abricot et de la couleur des coussinets.

Couleur de robe	Description de la couleur	Description de la teinte des coussinets
Caramel sur base bleue	Couleur grise/brunâtre plus sombre que le lilas, voire ressemblant à de la « boue ». Des reflets métalliques peuvent être perceptibles.	Coussinets mauves à bruns
Caramel sur base lilas	Couleur grise/brunâtre allant vers des tons chauds couleur miel. Chez les jeunes colourpoint, la couleur du « point » se développe plus rapidement que chez les chats lilas. Des reflets métalliques peuvent être perceptibles.	Coussinets plus sombres que chez un chat lilas, de teinte plutôt chocolat, avec des poils couleur chocolat entre les coussinets chez les jeunes
Caramel sur base faon	Couleur beaucoup plus chaude que le faon, rousse chocolat allant vers le	Coussinets de couleur mauve sauf chez les

	cinnamon avec des reflets bleus. Les chats caramel colourpoint sur base faon sont plus pâles que les chats caramel sur base faon unis mais sont aisément distingués des chats faon point. Des reflets métalliques peuvent être perceptibles. Cette couleur est plus rare que les autres caramel.	individus « point » où le nez et les coussinets sont roses.
Abricot	Couleur crème chaude légèrement rosée alors que chez le chat crème le crème est plutôt « poudré ». Teinte métallique plus perceptible avec la maturité surtout sur la tête, les pattes et autour des coussinets.	Roses

Chez les chats tabbies, le reflet métallique de la couleur est particulièrement visible sur le cou, le haut de la tête, la queue, les jarrets et le pourtour des coussinets. Ces reflets peuvent être moins perceptibles chez les chatons. Les figures 10 à 19 permettent d'illustrer par quelques exemples les couleurs caramel et abricot.

Un autre aspect particulier de l'allèle *Dm* réside dans son expressivité variable. Ceci signifie que cet allèle produit un effet fort chez certains chats et beaucoup moins chez d'autres, ce qui donne un spectre de nuances de caramel et d'abricot très varié. Cette variabilité est entre autre ce qui rend l'existence de cet allèle si controversée et renforce certains éleveurs et juges dans l'idée que ces couleurs sont uniquement le fruit de la variation naturelle observée dans les couleurs diluées.

B- Illustrations de chats caramel et abricot

a) Chats caramel sur base bleue

➤ *Sacré de Birmanie caramel sur base bleue*

Figure 10 : Sacré de Birmanie caramel sur base bleue.



Photographie Marianne Deblaere ©

Légende: **a**: 1 mois $\frac{1}{2}$; **b**: 3 mois; **c**: 8 mois; **d**: 3 ans

➤ ***Oriental caramel tabby spotted sur base bleue***

Figure 11 : Oriental caramel tabby spotted sur base bleue.



Photographie Carolin Skirl ©

➤ ***Tonkinois caramel point sur base bleue***

Figure 12 : Tonkinois caramel point sur base bleu.



Photographie Monika Wernli ©

b) Chats caramel sur base lilas

➤ ***Siamois caramel point basé sur lilas***

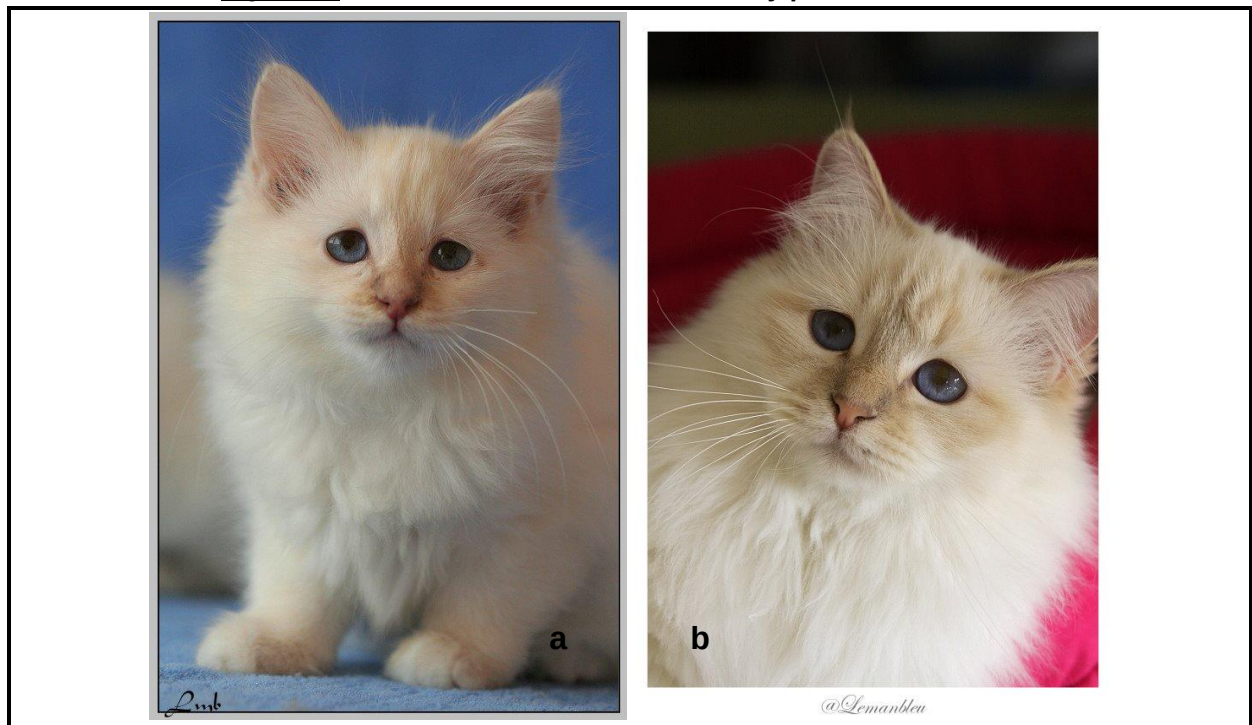
Figure 13 : Siamois caramel point sur base lilas.



Photographie Florence Bonvarlet ©

➤ ***Sacré de Birmanie caramel tabby point sur base lilas***

Figure 14 : Sacré de Birmanie caramel tabby point sur base lilas.



Photographie Marianne Deblaere ©

Légende: a: 2 mois $\frac{1}{2}$; b: 4 ans

c) Chat caramel sur base faon

➤ *Mandarin caramel ticked tabby sur base faon*

Figure 15 : Mandarin caramel ticked tabby sur base faon.



Photographie Gavin Tasker ©

d) Chats abricot

➤ *Oriental longhair abricot shaded*

Figure 16 : Oriental abricot shaded.



Photographie Florence Bonvarlet ©

➤ *Tonkinois abricot point*

Figure 17 : Tonkinois abricot point.



Photographie Monika Wernli ©

➤ ***Siamois abricot point***

Figure 18 : Siamois abricot point.



Photographie Ariane Inghels Lefebvre ©

➤ ***Oriental abricot***

Figure 19 : Oriental abricot.



Photographie Ariane Inghels Lefebvre ©

DEUXIEME PARTIE

Etude bibliographique de la mélanogenèse et de son déterminisme génétique

I- Le système pigmentaire

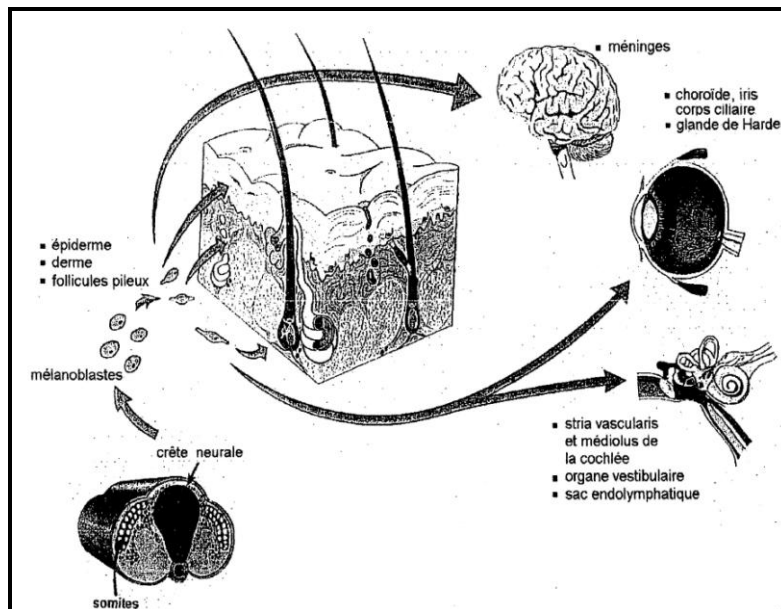
Au cours du développement embryonnaire, le système pigmentaire se met en place par migration et prolifération des précurseurs des mélanocytes dans la peau et dans les follicules pileux. C'est au sein des mélanosomes, organites apparentés aux lysosomes et présents exclusivement dans les mélanocytes que se synthétisent et se déposent les mélanines.

A- Développement embryologique des mélanocytes

a) Origine embryologique des mélanocytes (Aubin-Houzelstein, 1997)

La crête neurale est à l'origine de la plupart des cellules pigmentaires du corps des vertébrés, notamment des mélanocytes des follicules pileux, de l'épiderme et du derme. La figure 20 présente le devenir des cellules de la crête neurale.

Figure 20 : Devenir des mélanocytes issus de la crête neurale, d'après Boissy et Nordlung (1997)

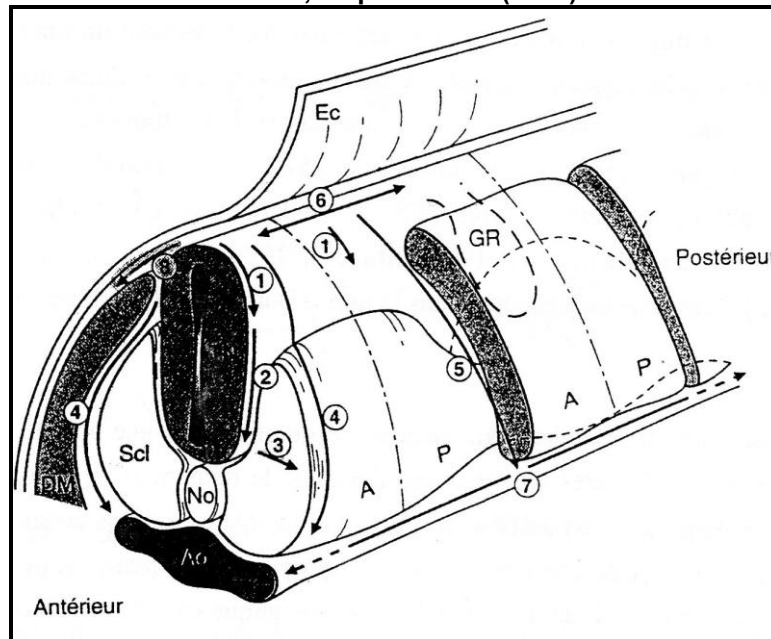


Structure transitoire des embryons des vertébrés, les cellules de la crête neurale s'individualisent lors de la fermeture de la gouttière neurale. Elles se spécialisent entre autres en mélanoblastes puis migrent à travers les tissus embryonnaires jusqu'à des sites précis où elles achèvent leur différenciation.

b) Migration et prolifération des mélanoblastes (Aubin-Houzelstein, 1997)

La figure 21 de Dulac (1993) représente les voies de migration des cellules de la crête neurale au niveau tronc, pendant leur trajet, les cellules pigmentaires présomptives ont une activité mitotique intense.

Figure 21 : Représentation des voies de migration des cellules de la crête neurale au niveau tronc, d'après Dulac (1993)



Après avoir quitté le tube neural (1) :

- (2) Des cellules de la crête neurale migrent selon un trajet dorso-ventral entre le tube neural et le sclérotome (Scl).
- (3) Ou dans la partie antérieure du somite (A) pour participer à la formation du ganglion rachidien (GR).
- (4) D'autres cellules migrent entre le sclérotome et le dermomyotome (DM).
- (5) Ou entre deux somites consécutifs.
- (6) Pour atteindre l'aorte dorsale (Ao) au niveau de laquelle se forment les chaînes sympathiques primaires. Les cellules de la crête neurale peuvent aussi suivre une voie longitudinale sous l'ectoderme (Ec).
- (7) Ou le long de l'aorte dorsale.
- (8) Puis, les futures cellules pigmentaires suivent une voie de migration particulière entre l'ectoderme et le dermomyotome.

Après une migration intra-dermique selon un axe dorso-ventral et cranio-caudal, les mélanoblastes atteignent leurs territoires définitifs soit la basale épidermique et les follicules pileux (Fargeas, 1995). Ils apparaissent vers le 29^{ème} jour de gestation chez la souris en région céphalique et thoracique dans les parties profondes du derme au contact des vaisseaux sanguins et atteignent également les cellules en division rapide du bulbe pileux. Ils acquièrent leur morphologie et leurs caractéristiques pigmentaires définitives du 37^{ème} au 40^{ème} jour de gestation chez la souris.

c) Colonisation des follicules pileux en formation par les mélanoblastes et

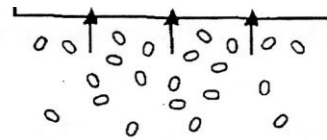
les mélanocytes épidermiques (Aubin-Houzelstein, 1997)

Figure 22 : Interactions épithélio-mésenchymateuses pendant le développement du follicule pileux, d'après Aubin-Houzelstein (1997)

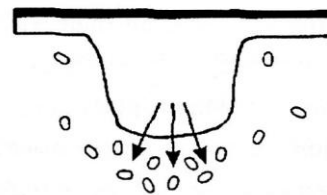
Au quinzième jour de gestation, chez la souris, on observe des épaisissements de l'épiderme qui s'invagine dans le derme pour former le bourgeon épidermique du follicule pileux.

L'invagination épidermique est sous contrôle notamment du derme, qui envoie des signaux chimiques à l'épiderme pour déclencher son invagination.

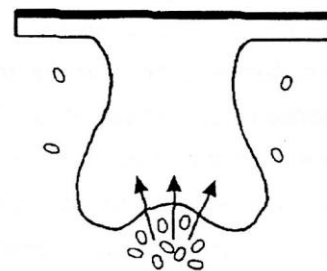
En réponse à un message envoyé par le derme, l'épiderme s'épaissit et s'invagine. Au cours de son invagination, il envoie un message au derme qui s'agrége en une papille dermique. Celle-ci envoie à son tour un message à l'épiderme qui forme le bulbe pileux. La figure 22 résume ces étapes.



Premier message dermique:
faire un bourgeon



Message épidermique:
faire une agrégation
mésenchymateuse

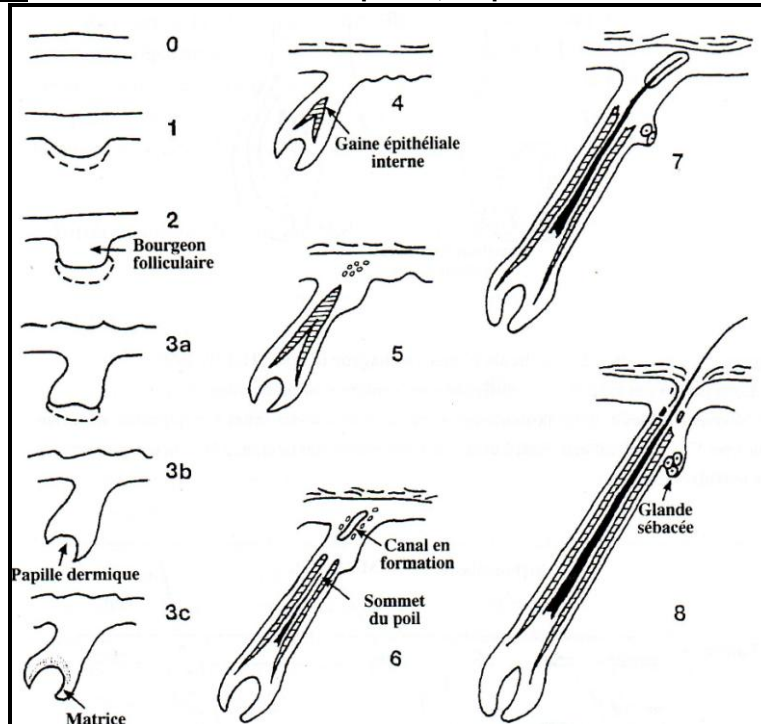


Deuxième message dermique:
faire un follicule pileux

Par la suite, le bourgeon épidermique de follicule pileux induit la condensation locale du mésenchyme dermique, qui se trouve progressivement entouré par l'invagination épidermique et constitue la papille dermique du follicule pileux. La papille dermique induit la prolifération rapide des cellules épithéliales de l'invagination épidermique. Ces cellules épidermiques à haute capacité mitotique forment la matrice du bulbe pileux. Les cellules filles de la matrice sont rejetées vers l'extrémité distale du follicule pileux en formation et se différencient selon leur position : les cellules les plus centrales forment le poil tandis que les plus externes donnent naissance à la gaine épithéliale interne.

L'ensemble de ces étapes est illustré dans la figure 23.

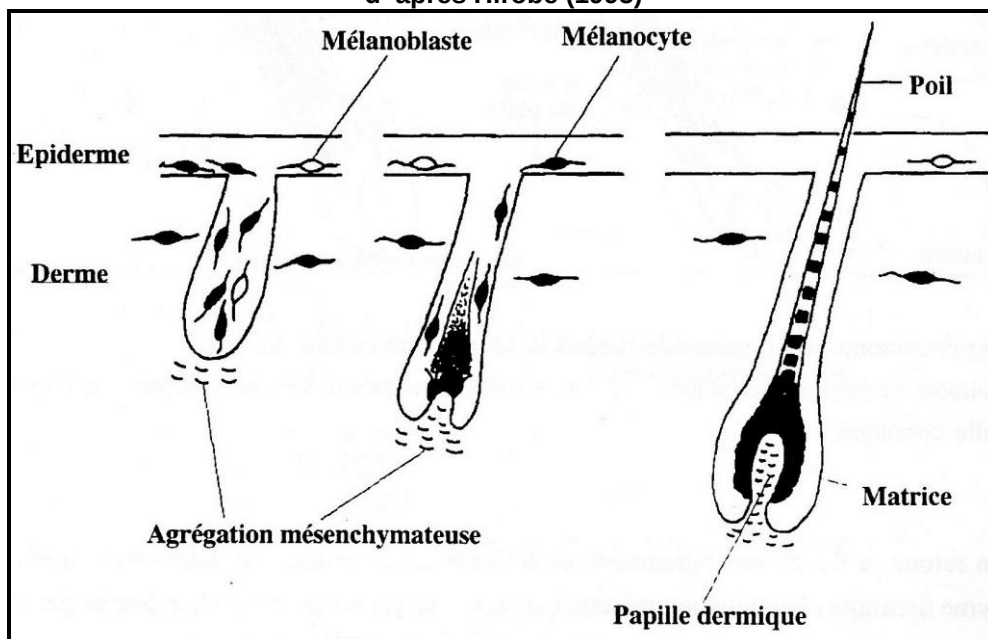
Figure 23 : Formation d'un follicule pileux, d'après Aubin-Houzelstein (1997)



En traits continus : cellules épidermiques ; en traits pointillés : agrégation mésenchymateuse.
 Etapes 0 à 2 : formation du bourgeon folliculaire par agrégation mésenchymateuse progressive.
 Etapes 3a et 3b : invagination épidermique et formation de la papille dermique
 Etape 3c : prolifération des cellules épithéliales pour former la matrice du bulbe pileux
 Etapes 4 à 8 : Transfert des cellules de la matrice vers le sommet du follicule pileux et différenciation en fonction de leur position pour donner le poil et les gaines du poil.

Lors de l'invagination épidermique, les mélanoblastes migrent depuis l'épiderme vers le follicule pileux en formation et colonisent la couche la plus interne de la matrice du bulbe pileux, comme illustré à la figure 24.

Figure 24 : Colonisation du follicule pileux en formation par les mélanoblastes et mélanocytes, d'après Hirobe (1995)



d) Différenciation des mélanoblastes en mélanocytes

(Fargeas, 1995)

Un mélanoblaste est une cellule à haut potentiel prolifératif, issu de la crête neurale, et n'ayant conservé que sa potentialité mélanocytaire. Une des différences majeures entre un mélanoblaste et un mélanocyte réside dans le stade des mélanosomes que chacune de ces cellules contiennent. En effet, les mélanosomes sont classés en quatre stades suivant leur état de maturation :

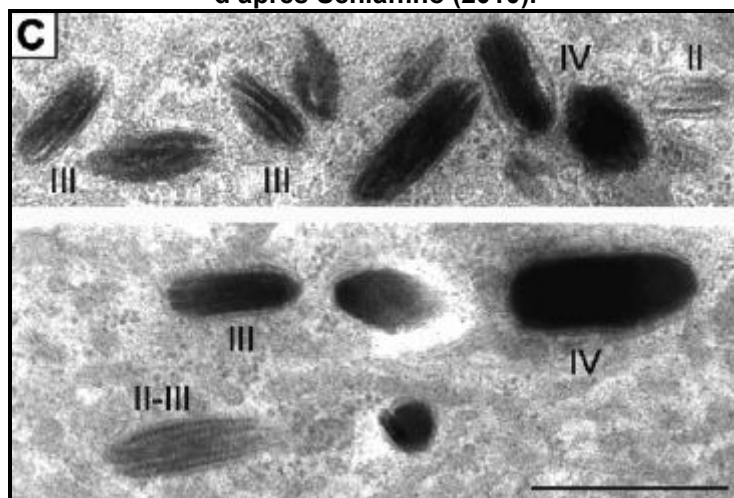
- mélanosomes de stade I : de forme sphérique, leur matrice ne comporte que des filaments mal définis.
- mélanosomes de stade II : ils ont une forme elliptique avec une matrice laminaire ou filamenteuse.

Les mélanoblastes contiennent uniquement des mélanosomes de stade I et II.

- mélanosomes de stade III : un léger dépôt de mélanine commence à envahir l'organe.
- mélanosomes de stade IV : la structure interne des mélanosomes de stade IV est complètement masquée par un dépôt intense de mélanine dans la matrice.

Un mélanocyte contient des mélanosomes de stade III et IV. Il est capable de les synthétiser grâce à son activité tyrosinase fonctionnelle (figure 25).

Figure 25 : Vue au microscope électronique de mélanosomes de souris de stades II, III et IV, d'après Schiaffino (2010).



Barre d'échelle : 1µm.

La présence exclusive de mélanine dans les stades III et IV s'explique par la voie de biosynthèse bipartite des mélanosomes. En effet, dans un premier temps, les mélanosomes de stade I bourgeonnent à partir de l'appareil de Golgi. Conjointement, des vésicules contenant de la tyrosinase se forment à partir de celui-ci. La fusion de ces vésicules de tyrosinase avec des mélanosomes de stade II initie alors le processus de mélanogenèse.

Un mélanocyte complètement différencié est donc caractérisé par son activité tyrosinase, la présence de mélanosomes matures dans son cytoplasme et sa forme

dendritique. Enfin, contrairement à la majorité des cellules différenciées, le mélanocyte conserve un potentiel mitotique.

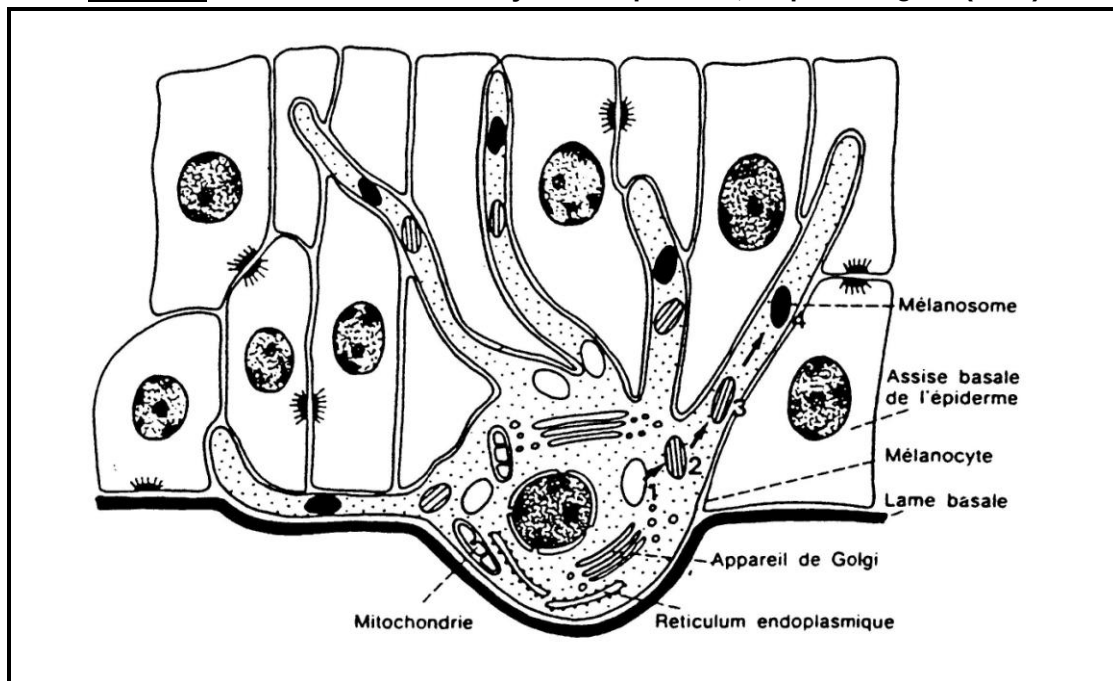
B- Le mélanocyte au sein du système pigmentaire

L'épiderme est un épithélium composé majoritairement de kératinocytes et, dans une moindre proportion, de mélanocytes. Ces cellules, pourtant minoritaires, sont de véritables usines dédiées à la synthèse d'un pigment, la mélanine. Dans la peau, les mélanocytes sont présents dans l'épiderme ainsi que dans les follicules pileux.

a) Structure du mélanocyte (Fargeas, 1995)

Le mélanocyte possède une morphologie caractéristique avec un corps cellulaire volumineux se plaçant entre la lame basale et l'assise basale, un noyau ovalaire à rond ainsi que des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites plus ou moins fins qui s'immiscent entre les cellules basales et les cellules de la couche profonde de l'épiderme. En sus des organites habituels -mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique- la cellule présente des formations ovalaires qui contiennent des pigments : les mélanosomes. Plus le mélanocyte est avancé dans sa différenciation, plus il possède des mélanosomes de stade IV en région périphérique et dans ses dendrites (figure 26).

Figure 26 : Schéma d'un mélanocyte de l'épiderme, d'après Fargeas (1995)



Les mélanocytes des follicules pileux se distinguent des mélanocytes épidermiques par leur plus grande taille et leurs dendrites plus développées et nombreuses. Les mélanocytes épidermiques et des follicules pileux sont en contact étroit avec les

kératinocytes, qui leur fournissent des facteurs de croissance. Les mélanocytes transmettent pour leur part la mélanine aux kératinocytes par les mélanosomes de stade IV (Aubin-Houzelstein, 1997).

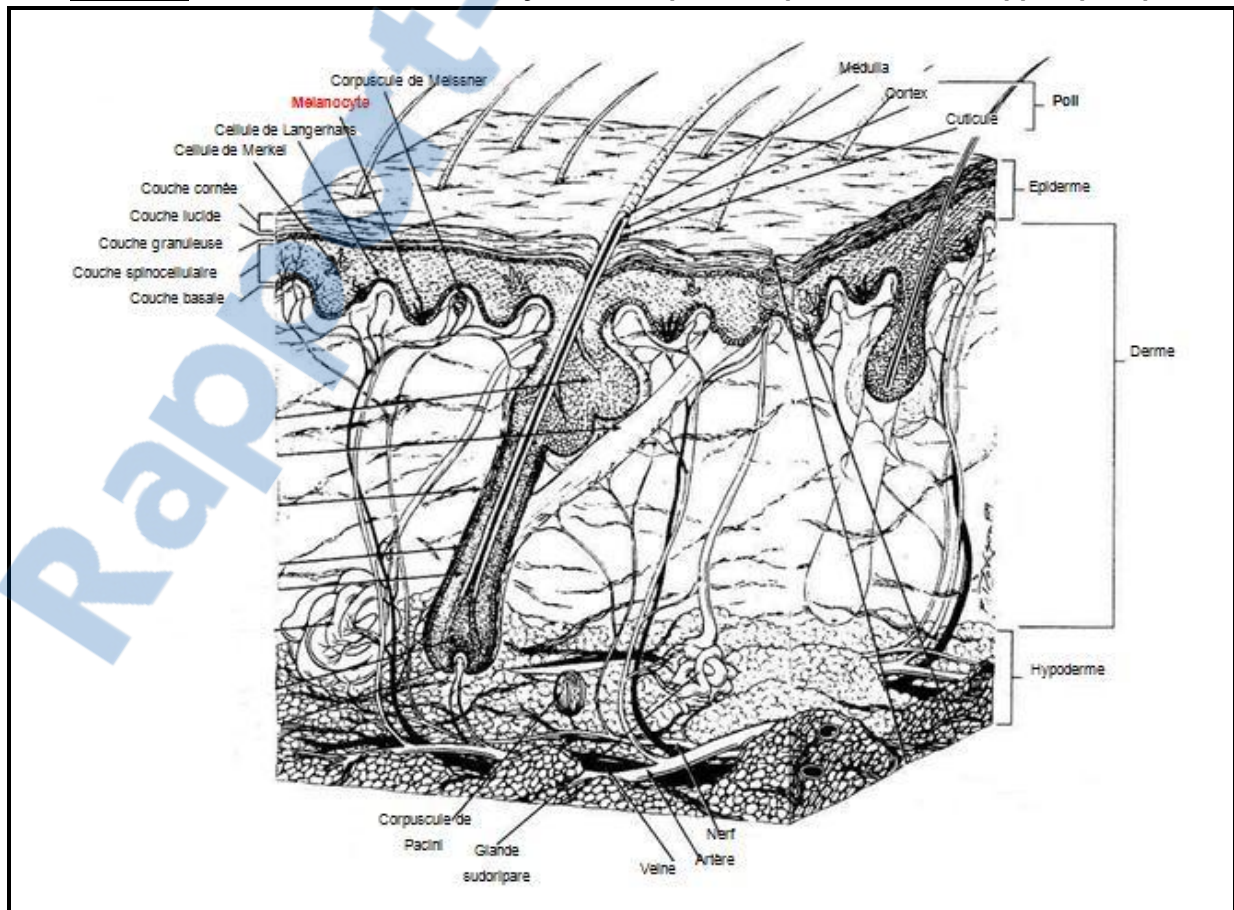
Les mécanismes du transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes sont encore sujets à débat et seront étudiés dans la suite de ce document.

b) Place des mélanocytes dans le tégument (Aubin-Houzelstein, 1997)

L'épiderme est un épithélium squameux stratifié, constitué essentiellement de cellules malpighiennes qui se kératinisent pour former les couches superficielles mortes de la peau ou couche cornée. Les cellules kératinisées superficielles sont continuellement desquamées à la surface et remplacées par des cellules résultant de l'activité mitotique des cellules de la couche basale, également appelée couche germinative de l'épiderme. Les cellules filles se kératinisent au fur et à mesure de leur trajet vers les couches superficielles au niveau desquelles leur cytoplasme est entièrement occupé par de la kératine.

Situés dans la couche basale de l'épiderme (figure 27), les mélanocytes ne représentent que 5% des cellules de l'épiderme et ne se kératinisent pas. Les mélanocytes des follicules pileux sont situés dans la matrice du bulbe pileux au dessus de la membrane basale épidermique, à proximité de la papille dermique.

Figure 27 : Localisation du mélanocyte dans la peau, d'après Eurell et Frappier (2006)



C- Place des mélanocytes dans le cycle pileux

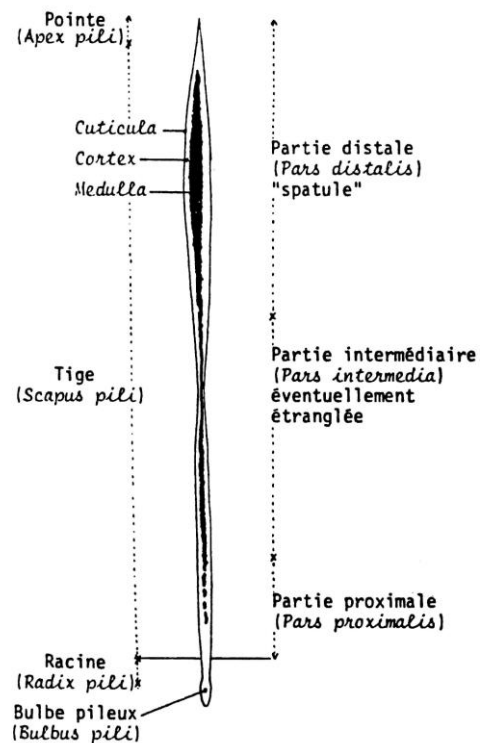
a) Le système pileux

a.1) Structure du poil

Anatomiquement, le poil contient 4 parties (figure 28) (Sautet, 1995) :

- le bulbe pileux,
- la racine,
- la tige, subdivisée en 3 parties :
 - tige proximale,
 - tige intermédiaire : la partie intermédiaire peut être rectiligne ou présenter des étranglements,
 - tige distale : s'élargit souvent en spatule avant de se terminer en pointe,
- la pointe du poil.

Figure 28 : conformation d'un poil de mammifère, d'après Sautet (1995)



Histologiquement, le poil se compose de 3 zones (Sautet, 1995) :

- une zone centrale médullaire : elle contient de nombreuses cellules lâches de forme cuboïdale ou aplatie, pigmentées. Dans la racine, la moelle est solide mais contient déjà des mélanosomes ;
- une zone périphérique corticale : couche compacte de cellules kératinisées, allongées dans le sens du poil, lamellaires, et reliées entre elles par de nombreux desmosomes. La pigmentation du cortex est diffuse. C'est lui qui assure la rigidité et la solidité du poil ;
- une cuticule écailleuse : composée de cellules kératinisées plates et transparentes également appelées écailles, qui sont disposées comme des tuiles. Leur bord libre est dirigé vers l'extrémité distale. Elle ne contient pas ou très peu de mélanosomes.

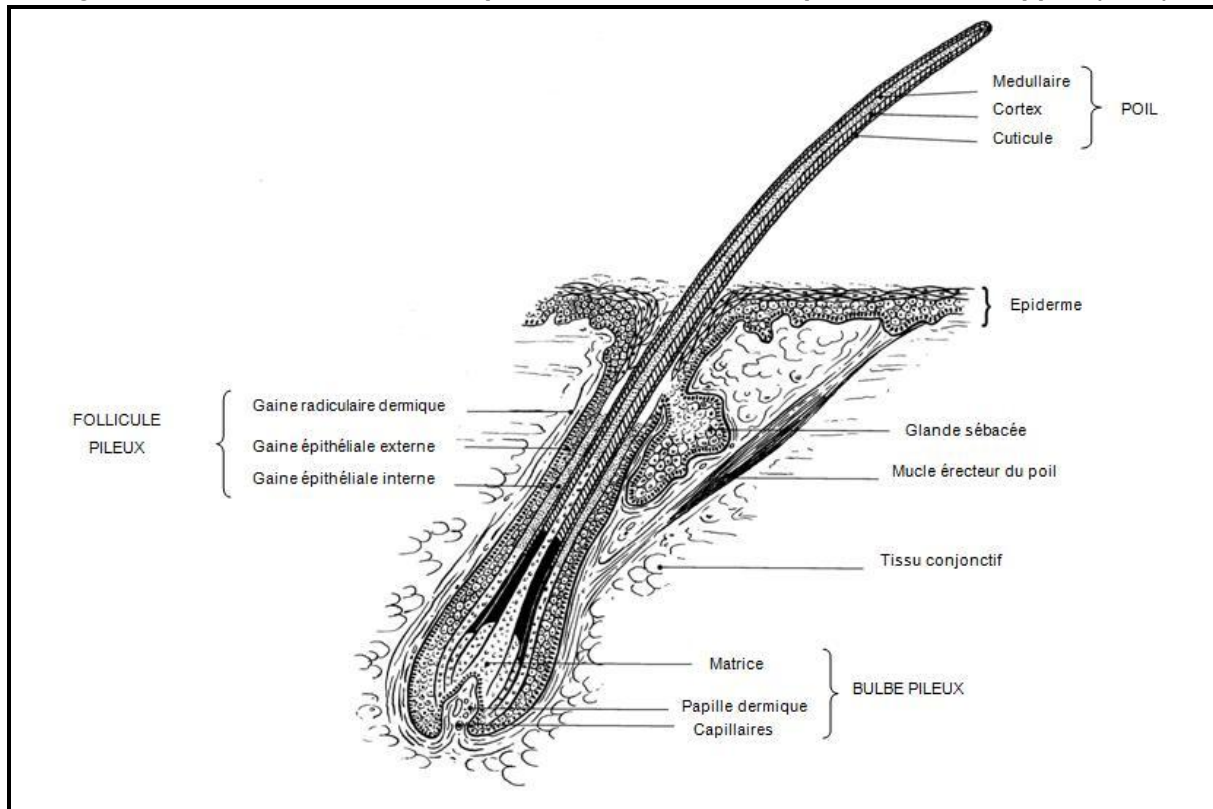
a.2) Structure du follicule pileux

Le poil est entouré d'une gaine cutanée entourant la racine du poil appelé follicule pileux, comme illustré sur la figure 29. Il s'agit d'une gaine mixte, de nature épithéliale et conjonctive composée de trois strates principales :

- la gaine épithéliale interne,
- la gaine épithéliale externe,
- la gaine radiculaire dermique. Elle est constituée de tissu conjonctif

s'appliquant contre le matériel épidermique invaginé.
 Les cellules qui recouvrent la papille dermique en une assise régulière sont les cellules matricielles du poil. Elles produisent de la kératine de façon intermittente suivant un cycle saisonnier, le cycle pileux.

Figure 29: Structure d'un follicule pileux de mammifère, d'après Eurell et Frappier (2006)



b) Le cycle pileux (Aubin-Houzelstein, 1997)

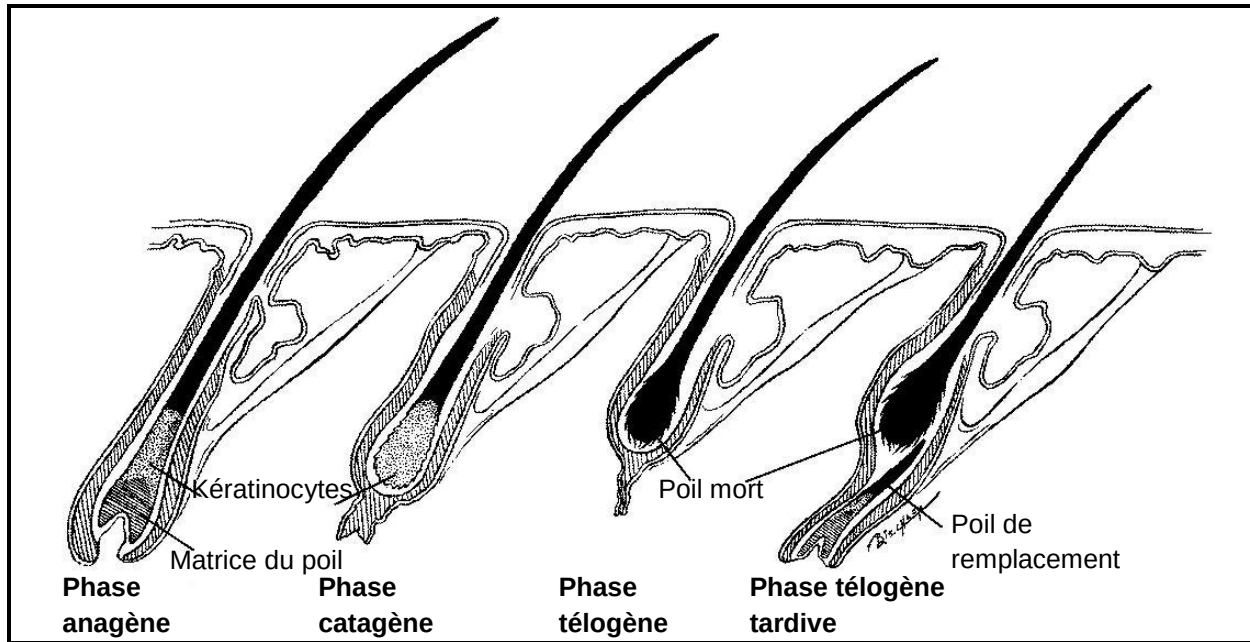
Les follicules pileux ont une croissance cyclique, divisée en plusieurs phases :

- la phase anagène ou de croissance durant laquelle l'épithélium devient actif tandis que le poil mort est éliminé et remplacé par un nouveau. Elle est divisée en 6 stades : anagènes I à VI ;
- la phase catagène ;
- la phase télogène durant laquelle la racine régresse et le poil, mort, est alors maintenu dans le follicule par sa cuticule.

La structure du follicule pileux est différente pour chacune des trois phases du cycle (figure 30).



Figure 30 : Cycle du follicule pileux, d'après Eurell et Frappier (2006)



En phase anagène, la papille dermique du bulbe pileux est bien développée, avec une matrice, produisant la gaine épithéliale interne et le poil, à forte activité mitotique. En phase catagène, le follicule régresse et les cellules de la papille dermique se rapprochent de la surface de la peau. Le bulbe pileux n'est plus constitué que de cellules fragiles et désorganisées.

En phase télogène, le follicule pileux est très raccourci. Le poil reste ancré grâce à des îlots kératogènes. La gaine épithéliale externe contient un groupe de cellules non différenciées et sans activité mitotique situées sous l'ouverture de la glande sébacée. Ces cellules seraient les cellules germinatives à l'origine d'un nouveau follicule pileux. En début de deuxième cycle lors des premiers stades anagènes, les cellules de la papille dermique envoient un message aux cellules germinatives qui forment un épaississement et entourent la papille dermique. Suit un second message de la papille dermique aux cellules épithéliales devenues cellules de la matrice du follicule pileux, ce qui stimule leur division. Les cellules de la matrice donnent naissance à une nouvelle gaine épithéliale interne et à un nouveau poil. La racine de l'ancien poil est alors poussée vers la surface au fur et à mesure de la croissance du nouveau poil puis finit par tomber.

c) La mélanogenèse au cours du cycle pileux (Aubin-Houzelstein, 1997)

La mélanogenèse n'a lieu qu'au cours des phases anagènes III à VI, par stimulation de l'activité sécrétrice des mélanocytes de la matrice. Elle cesse dès le début de la phase catagène et ne reprend qu'au début d'un nouveau cycle de croissance du poil. Vers la fin de la phase anagène, les mélanocytes perdent leurs dendrites, diminuent de taille et semblent moins pigmentés. Dans un follicule en phase télogène, une population de cellules quiescentes, non pigmentées et dendritiques, est

immédiatement adjacente à la papille dermique. Ces cellules dendritiques se divisent activement durant les premiers stades anagènes et se pigmentent pendant les stades III à VI, pour rentrer à nouveau en quiescence pendant la phase télogène.

II-Acquisition de la pigmentation

L'acquisition de la pigmentation est un processus complexe, qui nécessite que le développement embryonnaire du système pigmentaire se soit déroulé correctement et que tous les éléments impliqués dans le processus de pigmentation - mélanogénèse, biogénèse et transport des mélanosomes puis transfert des mélanosomes aux kératinocytes - soient fonctionnels.

A- La mélanogénèse

a) Les pigments mélaniques

La mélanogénèse a lieu dans les mélanosomes et conduit à la synthèse de mélanine qui est produite par deux voies distinctes :

- l'eumélanogénèse, produisant de l'eumélanine de couleur noire à marron, polymérisée en grand nombre,
- la phaeomélanogénèse, produisant de la phaeomélanine de couleur jaune à brun clair. Les phaeomélanines contiennent du soufre, sont plus claires et sont polymérisées en nombre plus restreint (Ito *et al.*, 2006).

Selon qu'ils contiennent l'un ou l'autre des pigments, les mélanosomes présentent des structures en microscopie électronique qui diffèrent. Les phaeomélanosomes ont une matrice non organisée, le pigment est déposé de façon aléatoire sur un enchevêtrement de fibres. Dans les eumélanosomes, les fibres sont parallèles, l'eumélanine est disposée de façon organisée sur la matrice (Aubin-Houzelstein, 1997).

La teneur de la cellule pigmentaire en composés soufrés est l'élément essentiel d'orientation soit vers l'eumélanogénèse (teneur faible) soit au contraire vers la phaeomélanogénèse (Fargeas, 1995).

b) Voies biochimiques de synthèse des eumélanines et phaeomélanines

b.1) Rôle central des enzymes mélanogéniques : mise en évidence par l'étude des albinismes oculo-cutanés 1 et 3

L'étude des albinismes oculo-cutanés de types 1 et 3 chez l'homme et la souris (OCA1 et OCA3) a permis de mettre en évidence le rôle central des enzymes transmembranaires spécifiques des mélanocytes lors de la synthèse des pigments mélaniques, et plus particulièrement de la tyrosinase TYR, de TYRP1 (*tyrosinase-related protein 1*) et TYRP2 également appelée DCT (DOPAchrome tautomerase). La tyrosinase catalyse la formation des précurseurs de la phaeomélanine et de

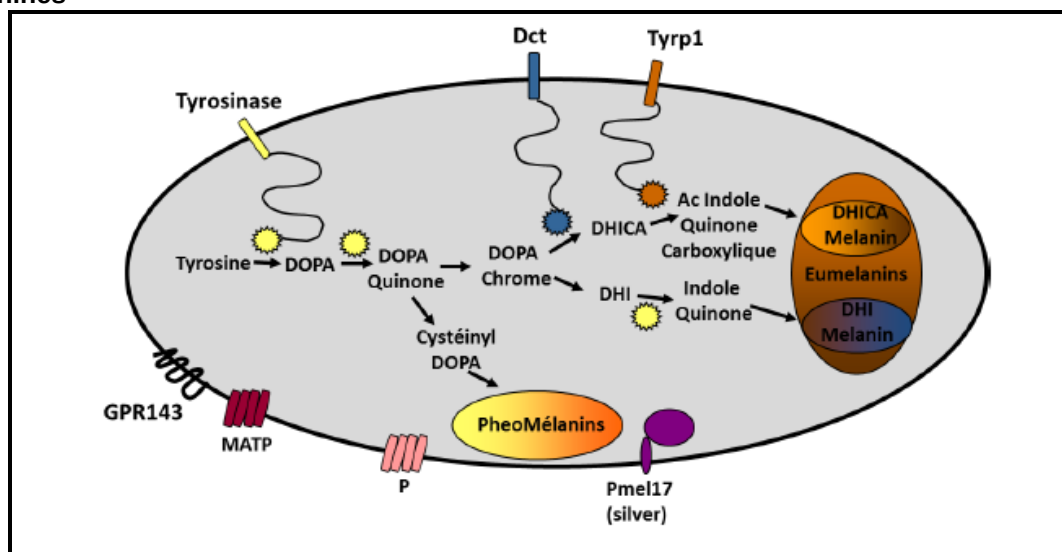
l'eumélanine, alors que TYRP1 et TYRP2 permettent la synthèse de l'eumélanine (Delevoye *et al.*, 2011).

L'albinisme regroupe un ensemble de troubles héréditaires résultant en une hypopigmentation variable de la peau, de l'iris et de la rétine, caractérisée par des défauts du nombre, de la structure et/ou de la fonction des mélanosomes. L'albinisme primaire est dû aux mutations d'au moins un des cinq gènes codant des protéines transmembranaires du mélanosome dont les fonctions sont essentielles à la synthèse du pigment et à la maturation du mélanosome : la tyrosinase, TYRP1, P (*pink eyed dilution*), MATP (*membrane-associated transporter protein*) également appelée SLC45A2 (*solute carrier 45A2*) et OA1 (*ocular albinism 1*) aussi appelée GPCR143 (*G protein-coupled receptor 143*) (Delevoye *et al.*, 2011).

Dans les OCA1 et OCA3, une mutation des gènes codant la tyrosinase et TYRP1 sont respectivement responsables d'une absence de pigment et d'une réduction de la quantité de mélanine (Yamaguchi *et al.*, 2007).

La figure 31 situe le moment d'intervention des enzymes TYR, TYRP1 et TYRP2/DCT dans la chaîne de synthèse des mélanines.

Figure 31 : Place des enzymes tyrosinase, TYRP1 et DCT dans la chaîne de synthèse des mélanines



d'après

http://document.cedef.org/enseignement/cours_semiologie/CEDEF_pigmentation_cutanee.pdf.

Légende : **DCT** : DOPACHrome Tautomérase ; **DHI** : 5,6-dihydroxyindole ; **DHICA** : acide 5,6-dihydroxyindolecarboxylique ; **DOPA** : L-3,4-dihydroxyphenylalanine ; **TYRP1** : *Tyrosinase-Related-Protein-1*

b.2) Etape commune à la synthèse de l'eumélanine et de la phaeomélanine

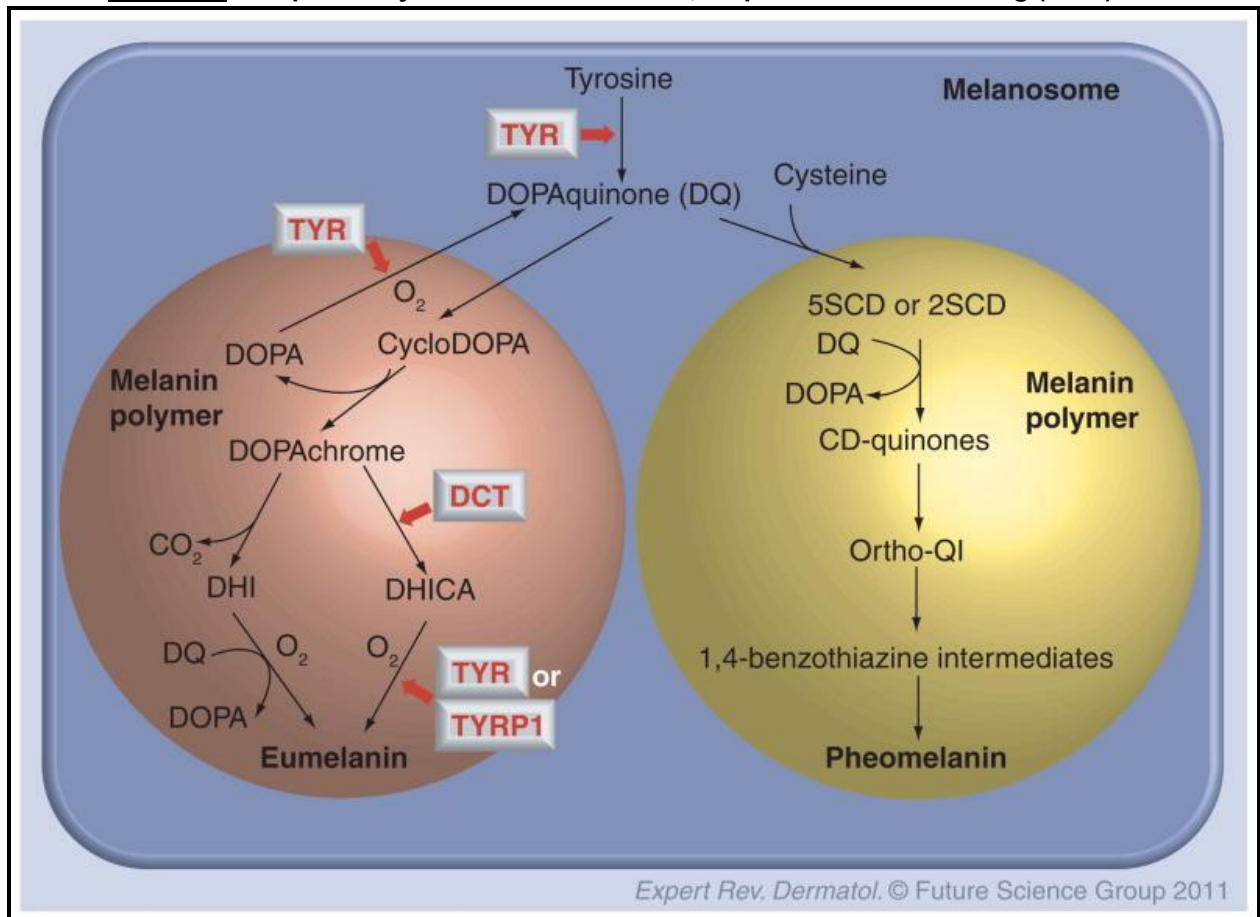
L' eumélanine et la phaeomélanine sont toutes deux dérivées du même précurseur : la DOPAquinone (DQ), formée suite à l'oxydation par la tyrosinase (TYR) de l'acide aminé L-tyrosine (Kondo et Hearing, 2011).

Au stade DQ :

- si des groupes sulfhydryls sont présents en quantité suffisante, des phaeomélanines sont synthétisées,
- sinon, c'est la voie du DOPAchrome qui est choisie avec formation spontanée de 5,6-dihydroxyindole (DHI) en présence de cations métalliques divalents. La DOPAchrome tautomérase accélère cette réaction pour produire de l'eumélanine (Cesarini, 1995).

La figure 32 présente la chaîne de synthèse des mélanines.

Figure 32 : Etapes de synthèse des mélanines, d'après Kondo et Hearing (2011)



Légende: **CD** : cystéinyldOPA ; **DCT** : DOPAchrome tautomérase ; **DHI** : 5,6-dihydroxyindole ; **DHICA** : acide 5,6-dihydroxyindolecarboxylique ; **DOPA** : L-3,4-dihydroxyphenylalanine ; **DQ** : DOPAquinone ; **Ortho-QI** : orthoquinonimine ; **TYR** : Tyrosinase ; **TYRP1** : tyrosinase-related-protein-2

b.3) L'eumélanogenèse

La première étape après la production de DOPAquinone (DQ) implique sa cyclisation spontanée en cycloDOPA, laquelle subit rapidement une transformation pour

produire une molécule de DOPAchrome et une molécule de L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) (Kondo et Hearing, 2011). La DOPAchrome est ensuite spontanément décarboxylée à pH neutre en 5,6-dihydroxyindole (DHI) et en acide 5,6-dihydroxyindolecarboxylique (DHICA) dans un ratio 70:1 (Palumbo *et al.*, 1987). En outre, en présence d'une enzyme spécifique produite par les mélanocytes, la DOPAchrome tautomérase (DCT), le DOPAchrome se tautomérise pour produire du DHICA exclusivement (Palumbo *et al.*, 1991). Enfin, le DHI et le DHICA sont oxydés et polymérisés pour former l'eumélanine. Durant l'eumélanogenèse, l'oxydation du DHI par une réaction d'oxydo-réduction avec DQ produit de l'eumélanine et du DOPA. Ce dernier rentre à nouveau dans la chaîne de synthèse de l'eumélanine en étant oxydé pour donner de la DQ par l'action directe de TYR chez l'homme (Olivares *et al.*, 2001) ou par TYRP1 chez la souris (Jimenez Cervantes *et al.*, 1994 ; Kobayashi *et al.*, 1994). Les activités de TYRP1 et TYRP2 (DCT) influent sur la quantité et la qualité de l'eumélanine, le ratio d'eumélanines dérivées de DHI ou DHICA et leur degré de polymérisation (Lamoreux *et al.*, 2001 ; Ozeki *et al.*, 1995).

Les mélanosomes fibrillaires sont caractéristiques de la production d'eumélanine et résultent de l'expression d'une protéine de structure, PMEL17, requise pour la production des fibrilles internes, lesquelles sont généralement absentes dans les mélanosomes contenant de la phaeomélanine (Theos *et al.*, 2005b).

b.4) La phaeomélanogenèse

La première étape est la réaction de la DQ avec la cystéine pour produire deux types de cystéinylDOPA (CD) isomères : la 5SCD et la 2SCD. Vient ensuite une réaction d'oxydoréduction entre CD et DQ conduisant à la production de CD-quinone et de DOPA. Enfin la CD-quinone se cyclise pour former de l'orthoquinonimine (QI) (Napolitano *et al.*, 2000). L'orthoquinonimine est réarrangée avec ou sans décarboxylation pour former des intermédiaires sous forme de 1,4 benzothiazine, finalement polymérisés en phaeomélanine (Wakamatsu *et al.*, 2009).

Si les activités de TYR, TYRP1 et DCT sont nécessaires pour l'eumélanogenèse, il est intéressant de noter que seul TYR est nécessaire pour la phaeomélanogenèse.

SLC7A11 (*solute carrier 7a11*) est un régulateur majeur de la phaeomélanogenèse. En effet, le gène *SLC7A11* code une protéine membranaire partie intégrante d'un complexe protéique permettant les échanges intercellulaires de cystine et glutamate. Chintala *et al.* (2005) ont démontré que chez les souris *sut* (*subtle gray*) mutées dans le gène codant *SLC7A11*, la diminution du taux de cystine dans les mélanocytes conduit à une inhibition de la phaeomélanogenèse. Cette mutation est en revanche sans effet sur l'eumélanogenèse.

b.5) Une mélanogenèse mixte au sein des mélanocytes

Les mélanocytes produisent à la fois de l'eumélanine et de la phaeomélanine, ainsi la mélanogenèse doit être considérée comme une mélanogenèse mixte.

Ito et Wakamatsu (2008) ont défini 3 étapes dans la synthèse de cette mélanogénèse mixte au sein du mélanocyte, où le taux de mélanine produite est proportionnel à la production de DQ, laquelle est à son tour proportionnelle à l'activité de TYR.

En fait, la mélanogénèse a lieu en 3 étapes :

- la première étape est la production d'isomères CD, qui continue aussi longtemps qu'il y a de la cystéine en concentration supérieure à 0,13 μM ,
- la deuxième étape est l'oxydation du CD pour produire de la phaeomelanine, qui continue aussi longtemps que les concentrations en CD sont supérieures à 9 μM ,
- la dernière étape est la production d'eumélanine, qui commence seulement après que la majorité du CD et de la cystéine soit utilisée. Par conséquent, le ratio eumélanine/phaeomélanine est déterminé par l'activité de TYR et les disponibilités en tyrosine et en cystéine dans les mélanosomes (Land *et al.*, 2003).

B- Biogénèse des eumélanosomes

a) Origine des mélanosomes

L'origine des mélanosomes a fait l'objet de plusieurs théories. Kushimoto *et al.* (2001) et Yasumoto *et al.* (2004) ont avancé l'hypothèse que les mélanosomes seraient issus du réticulum endoplasmique. Cependant, d'autres travaux tels que ceux de Raposo *et al.* (2001) et Berson *et al.* (2001) ont apporté des arguments en faveur d'une origine endosomale.

Il a été finalement établi que les mélanosomes appartiennent à la classe des organites apparentés aux lysosomes ou LRO (lysosome-related organelles). Ces organites sont présents dans différents types cellulaires : lymphocytes, macrophages, plaquettes et cellules endothéliales. Cette dénomination de LRO provient des caractéristiques qu'ils partagent avec les lysosomes : ils possèdent des protéines lysosomales (protéines de la membrane du lysosome et hydrolases), sont accessibles à la voie d'endocytose et leur pH est acide. La séquestration du pigment à l'intérieur des mélanosomes protège le mélanocyte des résidus oxygénés libérés lors de la synthèse et du transfert du pigment (Delevoye *et al.*, 2011).

La formation des mélanosomes dépend de protéines mélanosomales qui transitent par les voies de biosynthèse et d'endocytose et exploitent les mécanismes moléculaires du trafic intracellulaire. Les acteurs moléculaires impliqués dans le transport des protéines mélanosomales et la biogénèse des mélanosomes sont la cible de mutations dans des maladies génétiques. Les études menées sur les mélanocytes issus de souris modèles de ces maladies permettent de comprendre certaines des étapes-clés de la mélanogénèse ainsi que les dysfonctionnements associés à ces maladies (Delevoye *et al.*, 2011).

b) Aperçu général des étapes de formation des eumélanosomes

La biogenèse des phéomélanosomes ne sera pas abordée ici, elle reste en effet particulièrement mal connue.

Les eumélanosomes sont produits à partir d'endosomes non pigmentés immatures et se développent selon une série de stades, en périphérie du noyau du mélanocyte.

Quatre stades morphologiquement ont été identifiés. La mélanogenèse se déroule en deux étapes majeures qui permettent tout d'abord de former un organite immature non pigmenté (prémélanosomes de stades I et II) qui poursuit progressivement sa maturation en mélanosome pigmenté (stades III et IV) (Delevoye et al., 2011). Les mélanosomes matures, contenant la mélanine (stade IV), sont transportés grâce au réseau de microtubules et de filaments d'actine vers la périphérie de la cellule, dans les extrémités dendritiques, avant d'être transférés aux kératinocytes (Raposo et Marks, 2007).

La figure 33 illustre les dendrites mélanocytaires et les 4 stades vus en microscopie électronique.

Figure 33 : Mélanocytes en microscopie optique et mélanosomes en microscopie électronique, d'après Delevoye et al. (2011)

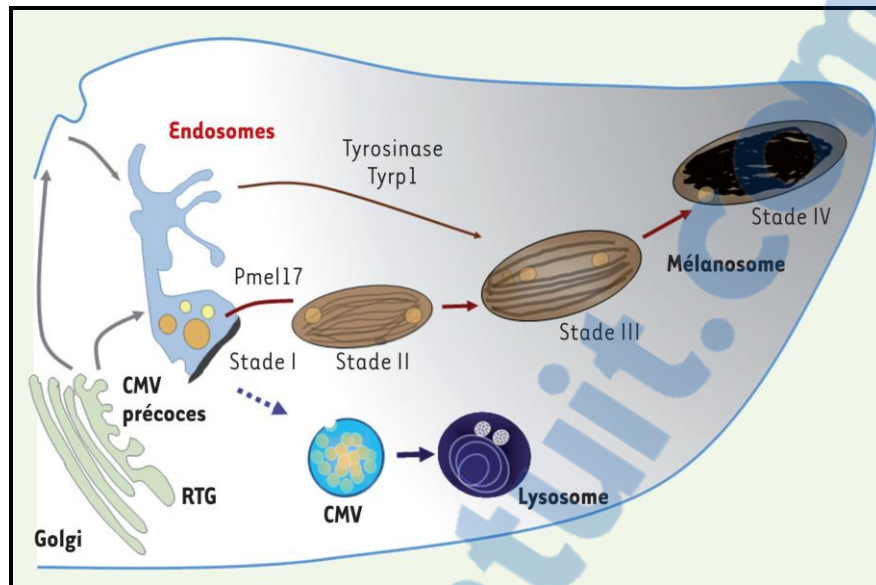


Les mélanocytes isolés, observés en microscopie optique (gauche), présentent de nombreuses extensions cellulaires où s'accumulent les mélanosomes. En microscopie électronique on distingue des mélanosomes noirs contenant la mélanine (mélanosomes matures) et des organites blancs non pigmentés, les prémélanosomes de stades I et II. Les dépôts de mélanine sont visibles dans les mélanosomes de stades III et IV en raison de leur densité électronique.

Échelle microscopie optique : 10 µm. Échelle microscopie électronique : 0,2 µm.

La protéine prémélanosomale PMEL17 transite par les endosomes précoces afin de générer les fibres intraluminales caractéristiques des prémélanosomes de stade II. Les enzymes de la mélanogenèse, tyrosinase et TYRP1, sont adressées depuis des intermédiaires endosomiaux aux mélanosomes en cours de maturation (stades II et III) comme figuré sur la figure 34 (Delevoye et al., 2011). Les étapes I à IV seront étudiées plus précisément dans les parties suivantes.

Figure 34 : La voie d'endocytose et la biogenèse des eumélanosomes, issu de Delevoye *et al.* (2011)



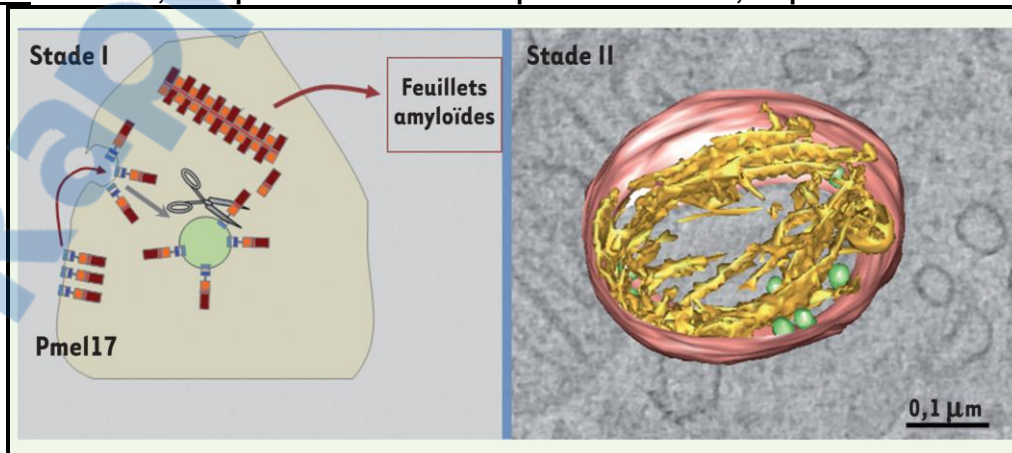
Légende : **CMV** : corps multi vésiculaires ; **RTG** : réseau trans golgien

c) Etapes endosomales de la mélanogenèse

Le stade I est caractérisé par la présence de vésicules intraluminales et de fibrilles qui émanent de la membrane intraluminaire. Le principal composant de ces fibrilles est le produit du locus *SILVER*, PMEL17, une protéine membranaire (Theos *et al.*, 2005b). Dans ces organites, PMEL17 est clivée par une prohormone convertase de la famille des furines ainsi que par d'autres protéases mal caractérisées, comme illustré sur la figure 35 (Delevoye *et al.*, 2011).

Le stade II, de forme ovale dont une reconstruction 3D est visible sur la figure 35, contient les domaines luminaux de PMEL17 libérés qui s'auto-assemblent et forment des fibres organisées en feuillets protéiques de nature amyloïde qui servent de support physique à la séquestration de la mélanine (Raposo *et al.*, 2001).

Figure 35 : PMEL17, composant des fibres des prémélanosomes, d'après Hurbain *et al.* (2008)



L'organisation du prémélanosome de stade II est mise en évidence par reconstruction 3D en tomographie électronique (droite). Le modèle 3D met en évidence des fibrilles jaunes émanant des vésicules intraluminales vertes au sein du prémélanosome de stade II.

d) Stades tardifs : des mécanismes établis grâce à l'étude de maladies génétiques

Dans le stade III, les enzymes tyrosinase et TYRP 1 sont transportées aux prémélanosomes par des intermédiaires endosomaux ; les pigments sont alors synthétisés et déposés jusqu'à formation complète du mélanosome de stade IV.

Wei (2006) a montré que ces étapes sont altérées dans une maladie génétique autosomique récessive accompagnée d'hypopigmentation, le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS). Le HPS résulte de la mutation de gènes codant des protéines qui participent à diverses étapes du trafic intracellulaire. L'étude de ce syndrome a permis d'établir les mécanismes impliqués lors de la maturation des stades III et IV.

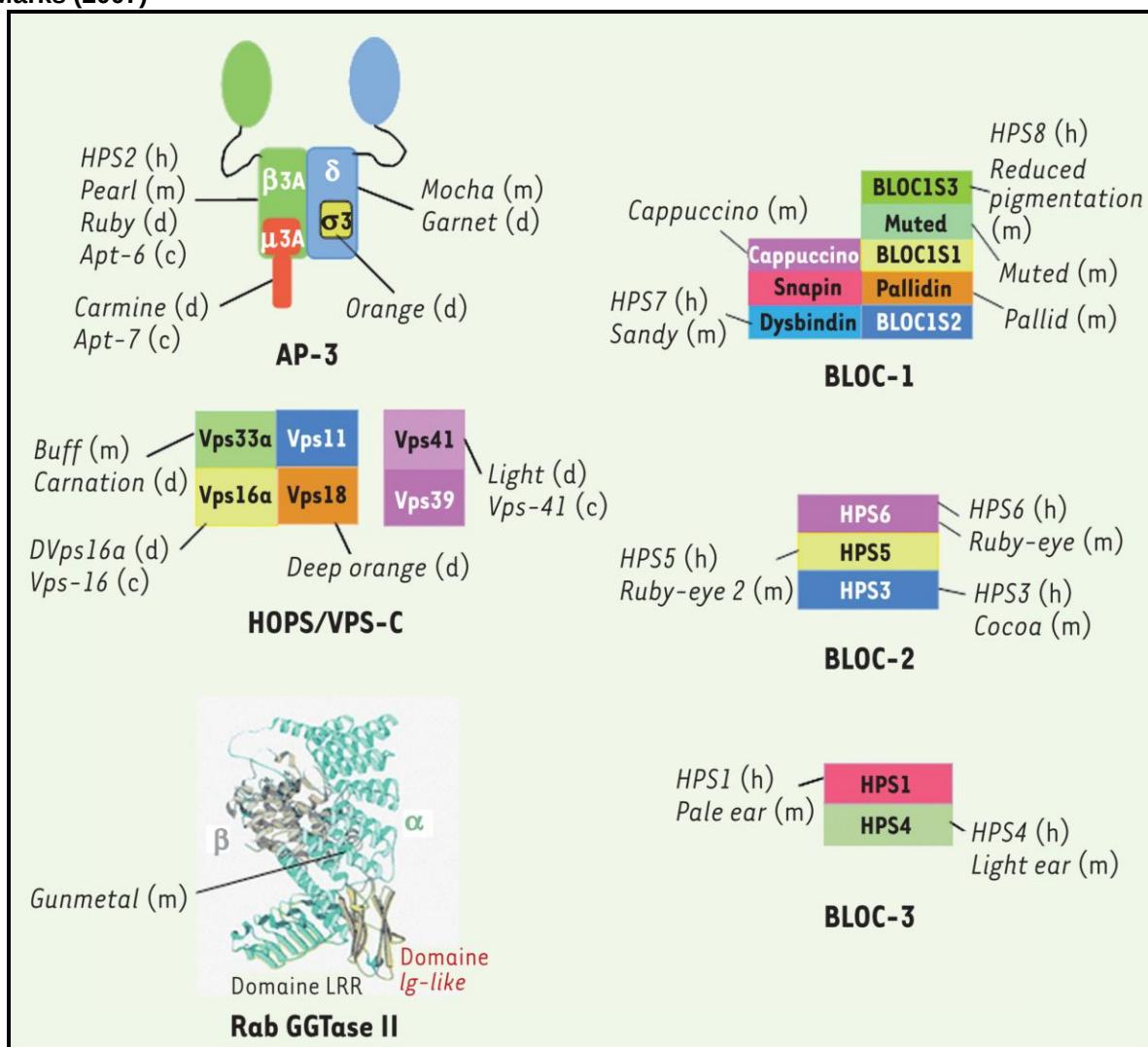
d.1) Le syndrome de Hermansky-Pudlak

(Delevoye *et al.*, 2011)

Le syndrome HPS est caractérisé par un albinisme oculocutané et des troubles associés au dysfonctionnement des différents LRO (défauts de coagulation, fibrose pulmonaire et immunodéficiences). Il résulte d'une mutation dans au moins un des huit gènes candidats chez l'homme et un des seize gènes chez la souris comme illustré sur la figure 36.

Même si les symptômes associés au HPS restent confinés aux types cellulaires qui produisent des LRO, l'expression des gènes mutés dans ces maladies est ubiquitaire. Certaines des protéines codées par ces gènes ont des fonctions déjà décrites comme l'adaptateur AP-3 (*adaptator protein 3*), le complexe HOPS (*homotypic protein sorting*) et l'enzyme RAB geranylgeranyl transferase II (RGGT II). Le complexe AP-3 interagit avec des séquences d'acides aminés présentes dans le domaine cytosolique de protéines transmembranaires. Il est impliqué dans leur transport des endosomes vers les lysosomes ou les organites apparentés aux lysosomes. Le complexe HOPS interagit avec les protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors*) impliquées dans la fusion membranaire. La RGGT II catalyse la prénylation de petites GTPases de la famille RAB, une modification nécessaire à leur association aux membranes. Au contraire, d'autres protéines n'ont pas de rôle connu, à l'instar de celles qui s'assemblent en des complexes nommés BLOC (*biogenesis of lysosome related organelles complex*). À ce jour, les protéines mutées dans le HPS semblent uniquement impliquées dans les stades tardifs de la mélanogenèse. Elles régulent le transport endosomal des enzymes de la mélanogenèse et de cargos nécessaires à leur activité enzymatique.

Figure 36 : Protéines mutées dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS), d'après Raposo et Marks (2007)



Cette figure illustre les sous-unités des différents complexes connus chez l'homme (h), la souris (m), la drosophile (d) ou le ver *Caenorhabditis elegans* (c). Les noms des mutations de souris (m) et des syndromes humains (h) sont indiqués en italique.

Structure de RGGT II : en vert le domaine hélicoïdal de la sous-unité α , en jaune le domaine Ig-like, en vert sous forme de feuillets le domaine LRR (leucine rich repeat) et en gris la sous-unité β .

d.2) Rôle des complexes adaptateurs AP-3 et AP-1

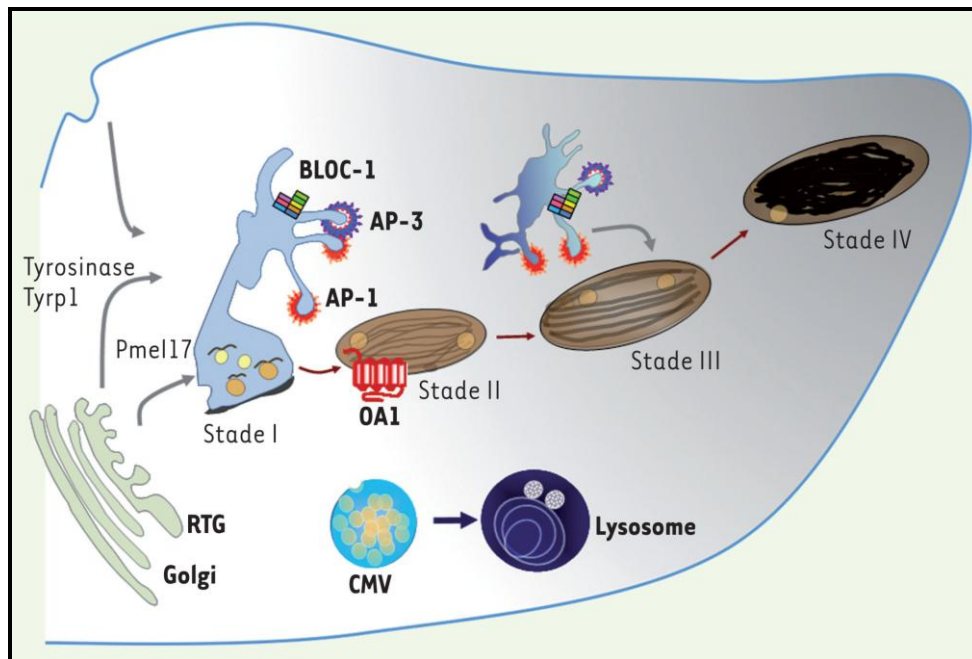
Pour véhiculer les protéines mélanosomales vers les mélanosomes, la cellule doit mettre en place des systèmes de reconnaissance qui permettent leur identification et leur tri parmi toutes les autres protéines de la cellule. AP-3 (*adaptor protein-3*) est l'un des quatre complexes adaptateurs hétérotétramériques. Il interagit avec des séquences d'acides aminés particulières (signaux di-leucine) situées dans les domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires et permet leur séquestration dans des intermédiaires de transport. Puis, ces derniers sont ciblés vers un compartiment avec lequel ils fusionnent pour y délivrer leur contenu (Delevoe *et al.*, 2011). Dans les mélanocytes, AP-3 interagit avec la tyrosinase et participe à son transport vers les mélanosomes (Theos *et al.*, 2005a). En effet, dans les mélanocytes issus de patients atteints de HPS2 ou de souris *pearl* ou *mocha*,

c'est-à-dire portant une mutation dans une des sous-unités du complexe AP-3, la tyrosinase s'accumule dans les endosomes (Theos *et al.*, 2005a). Comme AP-3 se localise dans des vésicules et bourgeons associés aux endosomes précoces, cela suggère que cet adaptateur transporte la tyrosinase des endosomes précoces aux mélanosomes (Theos *et al.*, 2005a). Cependant, AP-3 n'organise pas la totalité du transport des enzymes de la mélanogenèse car le pelage des souris *pearl* ou *mocha* est coloré (Gautam *et al.*, 2006), les mélanocytes de patients HPS2 produisent toujours des mélanosomes d'apparence normale, la rétention de la tyrosinase dans les endosomes reste partielle car elle se localise dans des vésicules de transport et enfin la TYRP1 n'interagit pas avec AP-3 et son transport aux mélanosomes n'est pas altéré en son absence (Theos *et al.*, 2005a).

Ces observations ont conduit à considérer le possible rôle d'un autre adaptateur moléculaire apparenté à AP-3, nommé AP-1, intact dans le HPS. AP-1 interagit avec les deux enzymes-clés de la mélanogenèse (TYR et TYRP1) et prend partiellement en charge le transport de la tyrosinase lorsque AP-3 n'est plus fonctionnel (Theos *et al.*, 2005a ; Delevoye *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'adaptateur AP-1 est également impliqué dans le positionnement des endosomes à proximité des mélanosomes grâce son interaction avec un moteur moléculaire, la kinésine KIF13A. Ce moteur, via son interaction avec AP-1, coordonne à la fois le tri des enzymes dans les endosomes ainsi que le transport et le positionnement de ces derniers à proximité des mélanosomes (Delevoye *et al.*, 2009). De plus, le moteur KIF13A et l'adaptateur AP-1 interagissent tous les deux avec le cargo TYRP1. A l' aide de ces observations, Delevoye *et al.* (2011) proposent un modèle selon lequel AP-1 et KIF13A, en association avec BLOC-1 et BLOC-2, réguleraient le tri des enzymes au niveau des endosomes précoces puis leur transport au contact des mélanosomes.

La figure 37 illustre les interactions entre ces complexes adaptateurs et les mélanosomes en devenir.

Figure 37 : Spécialisation du trafic intracellulaire dans le mélanocyte, d'après Delevoe et al. (2011)



Les adaptateurs AP-1 et AP-3 ainsi que les complexes BLOC régulent le transport des enzymes mélanosomales des endosomes aux mélanosomes. OA1 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires, localisé dans les mélanosomes immatures, qui contrôle la formation des prémélanosomes.

CMV : Corps multi-vésiculaire ; RTG : Réseau Trans-Golgien

d.3) Rôle des complexes BLOC

Au nombre de trois, les complexes BLOC sont formés de plusieurs protéines comme illustré sur la figure 36.

BLOC-1 est composé de 8 sous-unités : les gènes correspondant à deux d'entre elles sont mutés dans le HPS humain (Dysbindin-HPS7 et BLOC1S3-HPS8) et cinq sont mutés dans des modèles de souris du HPS donnant les mutations *capuccino*, *sandy*, *reduced pigmentation*, *muted* et *pallidin* (Raposo et Marks, 2007). Dans les mélanocytes de souris déficientes pour des sous unités de BLOC-1, la distribution de TYRP1 est très altérée par sa rétention massive dans les endosomes. En revanche, la localisation de la tyrosinase n'est que partiellement affectée. Bien que cette enzyme-clé soit encore présente dans les mélanosomes, les mélanocytes ne synthétisent plus de pigment. En effet une altération fonctionnelle du complexe BLOC-1 modifie fortement la distribution d'une protéine essentielle à la fonction de la tyrosinase, le transporteur du cuivre ATP7A (transporteur de Menkes). L'activité enzymatique de la tyrosinase est en fait dépendante de sa capacité à lier les ions cuivre (Setty et al., 2008). Ainsi, les mutations des sous-unités du complexe BLOC-1 altèrent, directement ou non, l'activité de deux enzymes-clés de la mélanogenèse, ce qui se traduit par une hypopigmentation importante.

d.4) Adressage des protéines cargo

Une fois le tri des protéines cargos de la mélanogenèse organisé au niveau des endosomes précoces, les intermédiaires de transport enrichis en ces cargos rejoignent le mélanosome. BLOC-2 pourrait être un acteur privilégié de ce processus.

Il se compose de 3 sous unités (HPS3, 5 et 6) (Di Pietro *et al.*, 2004) mutées chez les patients atteints du HPS et dans les souris *ruby-eye*, *ruby-eye-2* et *cocoa* (Gautam *et al.*, 2004). L'hypopigmentation observée lorsque BLOC-2 est mutée est moins sévère que celle qui accompagne les mutations de BLOC-1. Elle se caractérise par un défaut de distribution de TYRP1 et, dans une moindre mesure, de la tyrosinase qui s'accumulent dans des vésicules membranaires qui joueraient le rôle d'intermédiaire de transport à l'interface entre les endosomes précoces et les mélanosomes (Boissy *et al.*, 2005). De plus, BLOC-1 et BLOC-2 interagissent directement, suggérant fortement que ces deux complexes interviennent de manière séquentielle, en triant puis acheminant les cargos des endosomes aux mélanosomes (Di Pietro *et al.*, 2006).

d.5) Fusion des mélanosomes aux endosomes

La dernière étape permettant aux enzymes de la mélanogenèse de rejoindre leur destination est la fusion des endosomes avec les mélanosomes en cours de maturation. Dans les mélanocytes, le trafic endosome-mélanosome semble s'effectuer par l'intermédiaire de tubules membranaires (Delevoye *et al.*, 2009). Ces observations ne permettent pas de discriminer la nature antérograde ou rétrograde du transport qui s'opère via ces tubules membranaires et les deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives. Dès lors, le mélanosome poursuit vraisemblablement sa maturation grâce à la régulation de l'équilibre entre l'apport et l'export des protéines qui le composent (Delevoye *et al.*, 2011).

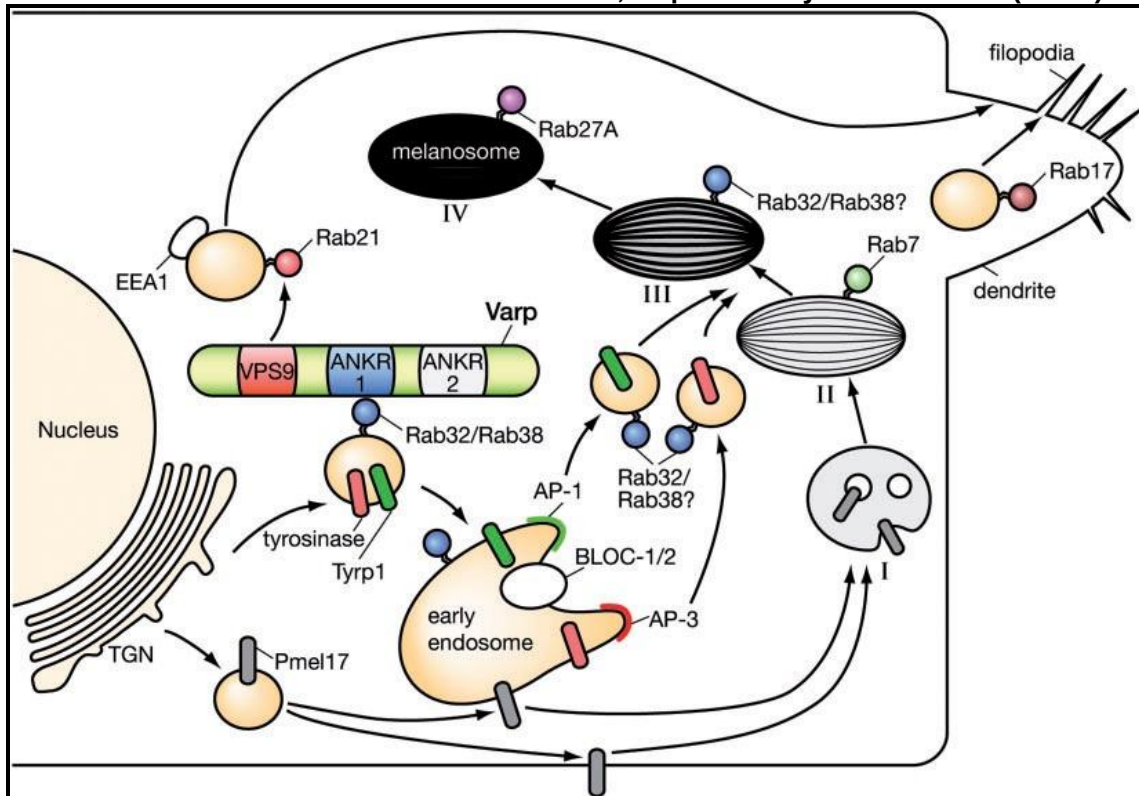
Le processus de fusion membranaire est régi par une famille de protéines appelées SNARE définies comme la machinerie moléculaire minimale responsable de la fusion des membranes biologiques. Actuellement, aucune d'entre elles n'a été directement impliquée dans ce processus au cours de la mélanogenèse (Wade *et al.*, 2001). Cependant plusieurs SNARE de la voie d'endocytose sont présentes à des taux élevés dans les mélanocytes et l'une d'entre elles, la syntaxine-13, interagit directement avec BLOC-1 ou le complexe HOPS (*homotypic protein sorting*) (Huang *et al.*, 1999). Cette SNARE est localisée dans les endosomes de recyclage (Prekeris *et al.*, 1998) et apparaît comme un bon candidat à la régulation de la fusion de ce compartiment avec les mélanosomes. Par ailleurs, la distribution de plusieurs SNARE endocytiques est altérée dans les mélanocytes déficients pour AP-3 ou BLOC-1, suggérant que ces complexes puissent moduler, directement ou non, l'activité de ces SNARE (Salazar *et al.*, 2006).

e) Rôle des protéines Rab dans la biogenèse des mélanosomes

Les RAB GTPases constituent une famille de petites GTPases régulant de nombreux systèmes de transports membranaires dans toutes les cellules eucaryotes en recrutant des molécules effectrices spécifiques. Certains membres de la famille des RAB GTPases sont d'ailleurs impliqués dans de nombreux processus physiologiques mais aussi pathologique chez les mammifères. En particulier, une déficience en protéines RAB38 et RAB27A, ainsi qu'une déficience de leurs régulateurs ou leurs

effecteurs causent des modifications de la pigmentation chez les humains et des variations de couleur de robe des souris, par les désordres que cela engendre dans le transport des mélanosomes, la biogenèse du mélanosome et son transport (Ohbayashi et Fukuda, 2012a). Le nombre de protéines RAB varie en fonction des espèces et environ 60 protéines RAB distinctes ont été identifiées chez les mammifères (Diekmann *et al.*, 2011). La figure 38 permet de situer l'action des protéines RAB lors de la biogenèse des mélanosomes et la formation des dendrites.

Figure 38 : Représentation des interactions des protéines RAB au cours de la biogenèse des mélanosomes et lors de la formation des dendrites, d'après Ohbayashi et Fukuda (2012a)



Le systèmes de transport endosomaux jouent un rôle essentiel dans le transport de la tyrosinase et de Tyrp1 car ces enzymes sont transportées du réticulum endoplasmique vers les mélanosomes de stade III par des endosomes. Les complexes BLOC- et AP- sont des acteurs clés de ce système de transport. AP-3 est nécessaire pour le transport de la tyrosinase tandis que BLOC-1/2 et AP-1 sont requis pour le transport de Tyrp1. Rab32/38 et Varp sont également nécessaires pour le transport des enzymes de la mélanogenèse.

Basrur *et al.* (2003) ainsi que Chi *et al.* (2006) ont montré qu'un certain nombre de protéines RAB sont associées aux mélanosomes, notamment RAB32 et RAB38, qui sont localisées sur les vésicules contenant la tyrosinase ainsi que la TYRP1 et/ou sur certains organites alentours. Il a été montré que la couleur chocolat chez des mutants de couleur de la souris était due à un dysfonctionnement de RAB38. Chez ces souris, le ciblage des vésicules contenant la tyrosinase et TYRP1 est légèrement défectueux ce qui provoque une légère dilution de couleur (Loftus *et al.*, 2002 ; Wasmeier *et al.*, 2006). RAB38 et RAB32 ont des fonctions redondantes au sein du mélanocyte puisqu'une déplétion supplémentaire de RAB32 en plus de RAB38

cause un déficit sévère de transport des tyrosinases et de TYRP1 jusqu'aux mélanosomes, causant une sévère hypopigmentation (Wasmeier *et al.*, 2006). RAB38 est également impliqué dans le transport des enzymes dans les cellules pigmentaires de la rétine. C'est également le gène en cause chez les rats *ruby*, qui présentent également une sévère hypopigmentation en plus de présenter toute une palette de déficiences relatives au HPS (Ohbayashi et Fukuda, 2012a).

Tamura *et al.* (2009) ont identifié une protéine de fixation spécifique à RAB32/RAB38, la protéine VARP (*VPS9-ankyrin repeat protein*, aussi appelée ANKR27). La protéine VARP contient un domaine N- Terminal VPS9 (*vacuolar protein sorting 9*) et un domaine C-Terminal composés de deux domaines *ankyrin-repeat* en tandem, nommés ANKR 1 et ANKR 2. Le domaine VARP VPS9 possède une activité RAB21-GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) et le domaine ANKR1 fonctionne comme un site de liaison spécifique des protéines RAB32 et RAB38. De plus, VARP interagit avec VAMP7/TI-VAMP (*vesicle associated membrane protein*) via la région située entre le domaine ANKR 1 et ANKR2, nommée VID (*VAMP-7 interaction domain*) (Tamura *et al.*, 2011). VARP et RAB32/38 sont aussi co localisés sur les vésicules contenant TYRP1 dans les mélanocytes et un *knock down* du domaine ANKR1, site de fixation de RAB32/38 cause une réduction dramatique de signal TYRP1 en périphérie des mélanosomes (Tamura *et al.*, 2011). Puisque la déficience du domaine ANKR1 de VARP est capable d'altérer le transport de TYRP1, l'interaction VARP-RAB32/38 est cruciale pour le transport de TYRP1 dans les mélanocytes (Tamura *et al.*, 2011). Par contre, la fonction du domaine VPS9 n'est pas nécessaire pour le transport de TYRP1 dans les mélanocytes, car un mutant déficient de l'activité RAB21-GEF conserve un transport normal des TYRP1 (Tamura *et al.*, 2011).

Hirosaki *et al.* (2002) et Kawakami *et al.* (2008) ont également montré l'implication d'autres membres de la famille des RAB protéines. RAB7 par exemple régule la motilité et la fusion des endosomes et des lysosomes, et est impliqué dans la maturation de la matrice protéique mélanosomique PMEL17 aussi bien que dans le transport de la tyrosinase et de TYRP1 jusqu'aux mélanosomes.

f) OA1 : un rôle encore méconnu

Le gène codant OA1, dont l'expression est restreinte aux cellules pigmentaires de la peau et des yeux, a été identifié il y a plusieurs années (Bassi *et al.*, 2001), mais sa fonction n'est toujours pas complètement comprise (Schiaffino, 2010). Il a été montré que OA1 est une glycoprotéine à sept domaines transmembranaires qui présente peu d'homologies de séquence mais d'importantes similitudes structurales et fonctionnelles avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, *G protein coupled receptor*) (Innamorati *et al.*, 2006). Les GPCR se localisent à la membrane plasmique et possèdent un domaine de liaison à un ligand extracellulaire qui peut être une hormone ou un neurotransmetteur. La liaison de ce ligand induit un

changement de conformation du récepteur qui interagit avec des GTPases intracellulaires ou protéines G, nommées Gi, Go ou Gq. Celles-ci modulent l'activité du GPCR et lui permettent d'envoyer des signaux intracellulaires en réponse aux stimuli physiologiques (Delevoye *et al.*, 2011). À l'instar des GPCR, OA1 lie un ligand, la L-DOPA (un produit intermédiaire de la voie de biosynthèse de la mélanine) (Lopez *et al.*, 2008), et interagit avec les protéines G de type inhibiteur (Gi) (Schiaffino, 2010). Cependant, dans les mélanocytes humains de la peau, OA1 s'associe majoritairement à la membrane des lysosomes et des mélanosomes immatures (stades I et II) (Giordano *et al.*, 2009). Sa distribution intracellulaire est due à deux motifs protéiques responsables de son tri, dont les mutations altèrent son trafic intracellulaire et sa fonction (Young *et al.*, 2008). Dès lors, la localisation d'OA1 aux membranes intracellulaires ainsi que sa topologie membranaire suggèrent que sa liaison à la L-DOPA intervient dans la lumière du mélanosome. Ainsi, OA1 pourrait transduire un signal de l'intérieur du compartiment vers le cytosol. Les maladies associées à l'albinisme oculaire de type 1 suggèrent que OA1 joue un rôle clé dans la maturation des mélanosomes. En effet, par l'intermédiaire d'une cascade de transduction dépendante de la protéine Gai3, OA1 régulerait la biogenèse des mélanosomes (Delevoye *et al.*, 2011). Des souris chez lesquelles l'expression de Gai3 est éteinte ont des phénotypes semblables à ceux observés dans l'albinisme oculaire de type 1 (Young *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré qu'OA1 participe aux étapes précoces de la mélanogenèse en contrôlant la composition protéique et l'identité des prémélanosomes (Giordano *et al.*, 2009). Par exemple, en l'absence d'OA1, les mélanocytes produisent des prémélanosomes anormaux qui accumulent à la fois les protéines de la prémélanogenèse (PMEL17) et celles de la mélanogenèse tardive (TYRP1). Ces observations suggèrent que la ségrégation et/ou le tri de ces protéines sont affectés (Giordano *et al.*, 2009). Dès lors, OA1 modulerait le trafic des protéines de la mélanogenèse en régulant négativement la maturation des mélanosomes (Giordano *et al.*, 2009).

C- Transport des mélanosomes au sein du mélanocyte

a) Déplacement des mélanosomes le long du cytosquelette

Les mélanosomes sont produits à proximité du noyau puis transportés le long de deux composants du cytosquelette : les microtubules, composés de dimères de tubuline α et β , et les filaments d'actine, composés de monomères d'actine. (Raposo et Marks, 2007). Les mouvements le long des microtubules, rapides et bidirectionnels, sont régulés par deux classes de protéines motrices : les kinésines et les dynéines. Les kynésines permettent le mouvement antérograde le long des microtubules c'est-à-dire de l'extrémité – vers + (vers la périphérie de la cellule) tandis que les dynéines sont responsables du transport rétrograde des mélanosomes le long des microtubules (Vallee *et al.*, 1988; Schnapp et Reese, 1989).

b) Mise en évidence des éléments clés dans le transport des mélanosomes grâce aux mutants de couleur

De nombreux facteurs clés sont impliqués dans le système de transport intracellulaire des mélanosomes dont de nombreuses RAB GTPases et leurs régulateurs. L'importance de ces facteurs est particulièrement mise en évidence chez des patients atteints du syndrome HPS, du syndrome de Griscelli ou du syndrome de Chediak-Higashi et chez des mutants de couleur chez la souris (Tomita et Suzuki, 2004; Di Pietro et Dell' Angelica, 2005). Il existe cinq modèles de souris caractérisées par l'incapacité partielle ou totale de transfert des mélanosomes. Ce sont les souris *dilute*, *ashen*, *leaden*, *gunmetal* et *beige*.

Le tableau 5 de Van den Bossche *et al.* (2006) présente les maladies génétiques humaines liées à un défaut des gènes codant la MyosinVa, RAB27a, la mélanophiline, la RAB géranylgéranyl transférase, LYST (*Lysosomal trafficking regulator*) et SERCA2 (*Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) et caractérisées par des défauts de pigmentation liés à un transport ou un transfert des mélanosomes défectueux.

Tableau 5 : Maladies génétiques caractérisées par des défauts de pigmentation liés à un transport ou un transfert des mélanosomes défectueux, d'après Van den Bossche *et al.* (2006)

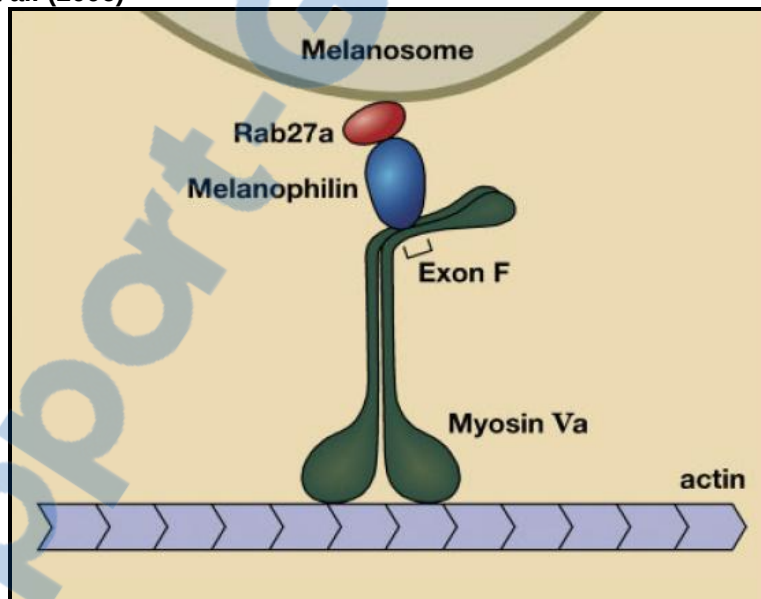
Disease	Mouse model	Gene	Function related to transfer
Griscelli type I	<i>dilute</i>	<i>MyosinVa</i>	Transport of melanosomes along the sublemmal actin network
Griscelli type II	<i>ashen</i>	<i>Rab27a</i>	Transport and tethering of melanosomes at the sublemmal actin network
Griscelli type III	<i>leaden</i>	<i>Melanophilin</i>	Transport and tethering of melanosomes at the sublemmal actin network
Hermansky Pudlak	<i>gunmetal</i>	<i>RGGT</i>	Prenylation of Rab proteins functioning in transport/transfer
Chediak-Higashi	<i>beige</i>	<i>Lyst</i>	Delivery of TGN-derived vesicles to premelanosomes? Specification of plasma membrane sites destined for transfer?
Guttate leucoderma in Darier's disease		<i>SERCA2</i>	Mediation of E-cadherin-based melanocyte-keratinocyte adhesion?

Les protéines RAB jouent un rôle prépondérant dans le transport des mélanosomes. Les RAB-GTPases jouent un rôle clé dans la régulation de diverses étapes du transport membranaire, notamment le tri des vésicules, la formation, le bourgeonnement et le transport des vésicules le long du cytosquelette ainsi que leur amarrage, leur attachement et leur fusion aux membranes cibles dans toutes les cellules eucaryotes. Les protéines RAB sont généralement présentes sous la forme de protéines inactives lorsque liées à un GDP (localisation cytosolique) et actives lorsque liées à un GTP (localisation membranaire). Le complexe RAB-GTP recrute des effecteurs moléculaires spécifiques pour des membranes spécifiques. Ces effecteurs exécutent ensuite divers rôle dans le trafic membranaire (Stenmark, 2009; Fukuda, 2008).

c) Le complexe RAB27a/MLPH/Myosin Va

Les mécanismes moléculaires du transport des mélanosomes le long des filaments d'actine ont été élucidés grâce à l'étude de trois gènes responsables des couleurs diluées chez la souris. *Dilute*, *ashen* et *leaden* sont les modèles de souris du syndrome de Griscelli (Westbroek *et al.*, 2001). Signalons que chez ce modèle animal, une mutation perte de fonction au locus *dilute suppressor* restaure la couleur de la robe des souris *dilute* et dans une moindre mesure des souris de robes *ashen* et *leaden* (O' Sullivan *et al.*, 2004, ce locus sera détaillé ci-après). La myosine Va ainsi que les protéines RAB27 et SLAC2-a également appelée MLPH (*melanophilin*), sont les protéines respectivement mutées dans les phénotypes *dilute*, *ashen* et *leaden* (Ohbayashi et Fukuda, 2012a). Ces molécules forment une protéine complexe en trois parties qui régule le transport des mélanosomes le long des filaments d'actine. La figure 39 représente ce complexe. Une perte de fonction d'une de ces protéines cause une agrégation périnucléaire des mélanosomes par défaut de transfert des mélanosomes des microtubules aux filaments d'actine (Ohbayashi *et al.*, 2012a).

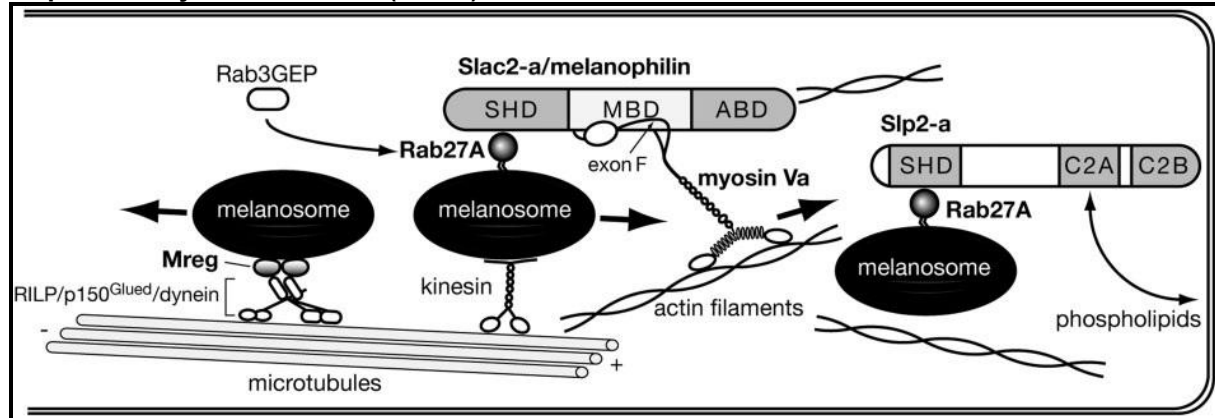
Figure 39 : Représentation schématique du complexe RAB27a/MLph/Myosin Va, d'après Steingrimsson *et al.* (2006)



d) RAB27A-RAB3GEP-RGGT

De nombreuses protéines RAB sont impliquées dans le transport des mélanosomes. La figure 40 permet de les illustrer.

Figure 40 : Protéines RAB régulant le transport des mélanosomes le long des microtubules, d'après Ohbayashi et Fukuda (2012a)



Mreg : Melanoregulin; **SHD** : *Slp* Homology Domain ; **MBD** : MyosinVa Binding Domain ; **ABD** : Actin Binding Domain; **RILP** : Rab Interacting lysosomal protein. Gènes identifiés chez la souris.

La forme active de la protéine RAB27A se lie à la surface du mélanosome par le site C-terminal « geranylgeranylation » et recrute l'effecteur de RAB27 spécifique des mélanocytes, c'est à dire la mélanophiline (MLPH). Le complexe résultant RAB27-MLPH fonctionne comme une protéine réceptrice dite « cargo » pour l'exon F du gène codant la protéine myosine Va, laquelle est abondamment exprimée dans les mélanocytes (Fukuda *et al.*, 2002 ; Hume *et al.*, 2006).

La mélanophiline est une molécule essentielle servant de lien entre les molécules composant le complexe RAB27A/MLPH/MyosinVa via le domaine SHD (*Slp* homology domain) et le domaine MBD (*MyosinVA* binding domain), respectivement responsables de la liaison de RAB27A et de la myosine Va. Par ailleurs, le domaine C-terminal de MLPH, ABD (*actin* binding domain), est capable de lier l'actine (Kuroda *et al.*, 2003). Ces interactions sont impliquées dans le transfert des mélanosomes des microtubules vers les filaments d'actine.

SLP2-a (*synaptotagmin-like protein*) est un second effecteur de RAB27A dans les mélanocytes et est composé d' une extrémité Nterminale SHD et d' une extrémité C terminale en tandem -C2A et C2B- dont le rôle est essentiellement de lier la phosphatidylserine, un composant majeur du feuillet cytosolique de la membrane plasmique. SLP2-a régule l'ancrage des mélanosomes à la membrane plasmique des mélanocytes (Kuroda et Fukuda, 2004).

Le ciblage membranaire de RAB27A est l'événement majeur conditionnant le déplacement des mélanosomes le long des filaments d'actine. De nombreux facteurs ont été cités comme ayant un rôle dans l'activation ou l'inactivation de la reconnaissance des mélanosomes par RAB27 dans les mélanocytes. RAB3GEP (aussi appelée DENN/MADD) est capable d' activer RAB27A dans les mélanocytes

(Figueiredo *et al.*, 2008) tandis que EPI64 est capable d'inactiver RAB27A (Itoh et Fukuda, 2006). Ainsi un *knockdown* de RAB3GEP et une surexpression de EPI64 dans les mélanocytes induit une agrégation périnucléaire des mélanosomes, donnant le même phénotype que chez les souris *ashen*, *dilute* et *leaden* (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Itoh et Fukuda, 2006). En complément de l'activation et de l'inactivation des protéines RAB, la geranylgeranylation C-terminale par la RAB geranylgeranyltransferase (RGGT) est requise pour l'association des membranes et leur stabilité.

Les souris *gunmetal* constituent le modèle du syndrome HPS. Il a été montré que le gène affecté code la sous-unité α de la RGGT qui contrôle l'association des membranes et donc l'activation des protéines RAB. Les mélanosomes sont entièrement mélanisés bien que de plus petite taille et sont normalement distribués au sein des cellules (Zhang *et al.*, 2002). Le nombre de mélanosomes intracellulaires est cependant augmenté ce qui suggère des défauts de sécrétion (Nguyen *et al.*, 2002). Il a été supposé que d'autres RGGT sont impliqués dans le transport et/ou le transfert des mélanosomes. RAB8 a ainsi été signalé comme régulateur des mouvements des mélanosomes grâce à l'actine (Chabrilat *et al.*, 2005).

e) Le syndrome de Chediak-Higashi et la protéine LYST

Le syndrome de Chediak-Higashi est lui représenté par le modèle de souris *beige*. Cette maladie génétique autosomique récessive est caractérisée par la formation de mélanosomes géants hypomélanisés et dont la capacité de transfert aux kératinocytes environnants est nulle. Il a été montré que le gène défectueux en cause est le gène *LYST* (*lysosomal trafficking regulator*) qui code une protéine cytosolique de 429 kDa (Introne *et al.*, 1999) intervenant lors du trafic des organites dérivés des lysosomes. Cette maladie a été identifiée chez plusieurs espèces dont l'homme (Nieuwenhuis *et al.*, 1987), la souris (Perou *et al.*, 1996 ; Nagle *et al.*, 1996), le rat (Nishimura *et al.*, 1989), le chat (Kramer *et al.*, 1977), les bovins (Padgett *et al.*, 1964) et le vison (Anistoroaei, 2013).

La protéine LYST/CHS1 appartient à la famille des BEACH (*BEige And CHediak*) protéines. Les fonctions des membres de cette famille ne sont pas encore totalement élucidées (Durchfort *et al.*, 2012). Dans les mélanocytes, la taille des mélanosomes est régulée par une balance entre la fusion et la fission des prémélanosomes. Durchfort *et al.*, (2012) ont montré que les mélanosomes de grande taille observés dans le cas où la protéine LYST est mutée résultent d'une diminution des phénomènes de fission et non d'une augmentation des phénomènes de fusion des vésicules.

f) Transport rétrograde des mélanosomes le long des microtubules

f.1) RAB7/RILP

Jordens *et al.* (2001, 2006) ont étudié le transport rétrograde de mélanosomes immatures et montré que RAB7 et sa molécule effectrice, RILP (*RAB7-interacting lysosomal protein*) sont localisés sur les membranes des endosomes matures et des

lysosomes (Cantalupo *et al.*, 2001) mais aussi dans les mélanosomes immatures PMEL17 positifs.

RILP est associée au complexe moteur dynéine-dynactine via la protéine de liaison p150^{Glued}, un composant du complexe de la dynactine, et régule le transport rétrograde sur les microtubules des endosomes tardifs et des lysosomes. RAB7 régulerait ainsi préférentiellement le transport rétrograde des mélanosomes immatures (Jordens *et al.*, 2006). Cependant il a été montré que RAB7 n'est pas impliquée dans le transport rétrograde des mélanosomes matures au contraire de la mélanoréguline qui agit avec le complexe moteur dynéine-dynactine pour le transport rétrograde des mélanosomes matures (Ohbayashi *et al.*, 2012b).

f.2) La mélanoréguline et le locus dsu

La mélanoréguline, produite par le gène *MREG* est impliquée dans la régulation du transport des mélanosomes dans les mélanocytes épidermiques chez les mammifères. Nous allons détailler l'étude du gène *MREG* chez la souris, ce gène faisant l'objet d'une partie du travail expérimental de ce manuscrit.

g) Etude détaillée du locus *dilute suppressor* (*dsu*) et du gène *MREG*

g.1) Découverte du locus dilute suppressor

En 1983, Sweet identifie un des premiers supresseurs de mutation chez les mammifères, *dilute suppressor* (*dsu*) qui possède la capacité de restaurer la couleur de la robe des souris d^v/d^v porteuses homozygotes de l'allèle d^v de dilution. Le gène *MREG* code la mélanoréguline, une molécule impliquée dans la régulation du transport des mélanosomes dans les mélanocytes épidermiques chez les mammifères (Damek-Poprawa *et al.*, 2009). Damek-Poprawa *et al.* (2009) ont montré que la mélanoréguline joue également un rôle dans la fonction lysosomale en médiant la maturation des hydrolases des lysosomes.

g.2) Impact de la mutation dsu sur les couleurs des robes des souris

Les souris *dilute* (d^v/d^v) présentent une agrégation périnucléaire des mélanosomes due à l'incapacité de la myosineVa à capturer les mélanosomes et à les transporter le long des filaments d'actine vers les dendrites. Deux autres souris porteuses de mutations de couleur, les souris *ashen* (*ash*) et *leaden* (*ln*) ont des phénotypes similaires aux souris *dilute*. *Ash* et *ln* codent RAB27A et la mélanophiline qui constituent un complexe avec la myosineVa. Quand une des protéines de ce complexe est mutée, les mélanosomes ne sont pas acheminés vers les extrémités dendritiques des cellules et la robe paraît plus claire. *Dsu* peut aussi supprimer la dilution des robes des souris *ash* et *ln* bien que cette suppression ne soit pas complète comme avec les souris *dilute* (figure 41) (Moore *et al.*, 1988a).

Figure 41 : Souris *ashen* (a), *ashen/dilute* (b), *dilute* (c), *ashen/dilute/dilute suppressor* (d) et *dilute/dilute suppressor* (e)



d'après www.informatics.jax.org/image/MGI:3587262

Moore *et al.* (1990) ont montré que *dsu* ne peut pas supprimer la dilution de couleur de robe de 14 autres souris porteuses d'une mutation qui agit par d'autres voies que celles précédemment citées. Le tableau 6 présente leurs résultats. *Dsu* a eu un effet uniquement sur la couleur des yeux des souris *ruby-eye-2j*, *ruby-eye-2 haze*, *ruby-eye*.

Tableau 6 : Effet de *dsu* sur la couleur de robe et des yeux de 17 souris mutants de couleur, d'après Moore *et al.* (1990)

Mutation	Gene symbol	Coat color	Eye color
Dilute ^a	<i>d</i>	Yes	— ^b
Ashen ^a	<i>ash</i>	Yes	—
Leaden ^a	<i>ln</i>	Yes	—
Pink eye	<i>p</i>	No	No
Pink eye unstable	<i>p^{un}</i>	No	No
Brown-J	<i>b^J</i>	No	—
Brown light	<i>B^{lt}</i>	No	—
Piebald	<i>s</i>	No	—
Cocoa	<i>coa</i>	No	No
Taupe-3J	<i>tp^{3J}</i>	No	—
Misty	<i>m</i>	No	—
Microphthalmia white	<i>Mi^{wh}</i>	No	No
Pale ear	<i>ep</i>	No	(?)
Pallid	<i>pa</i>	No	No
Ruby-eye-2J	<i>ru-2^J</i>	No	Yes
Ruby-eye-2 haze	<i>ru-2^{hz}</i>	No	Yes
Ruby-eye	<i>ru</i>	No	Yes

^a MOORE *et al.* (1988b).
^b The dash indicates that the eyes of the mice carrying these mutations are black. Therefore no effect of *dsu* upon these phenotypes can be observed.

No= non ; Yes=oui

g.3) Le gène de la mélanoréguline et sa mutation

Au locus *dsu* (situé sur le chromosome 1 de la souris) siège le gène de la mélanoréguline (*MREG*) alors que le locus *dilute* a été localisé sur le chromosome 9 (Moore *et al.*, 1988a). Des études ont montré que la mutation *dsu* agit sur un mode semidominant ; les souris $d^v/d^v, dsu/+$ sont plus claires que les souris $d^v/d^v, dsu/dsu$ mais plus sombres que les souris $d^v/d^v, +/+$ (Moore *et al.*, 1988b). Pour déterminer si *dsu* est un suppresseur autonome ou non autonome, Moore *et al.* (1994) ont créé des souris chimériques par agrégation d'embryons d^v/d^v avec des embryons $d^v/d^v, dsu/dsu, c^{2j}/c^{2j}$ (c^{2j} représente un allèle du locus *tyrosinase* *TYR*). Ces expériences ont suggéré que *dsu* est un suppresseur autonome dans les mélanocytes de la peau et code un produit non diffusible.

O' Sullivan *et al.* (2004) ont cloné le gène *MREG* codé au locus *dsu* et ont montré que la mutation chez les souris mutées *dsu/dsu* consistait en une délétion des deux premiers exons sur les cinq exons qui constituent le gène sauvage chez la souris non mutée $+/+$. Cette délétion aboutit à la non expression de la protéine codée par le gène *MREG* chez les souris *dsu/dsu*.

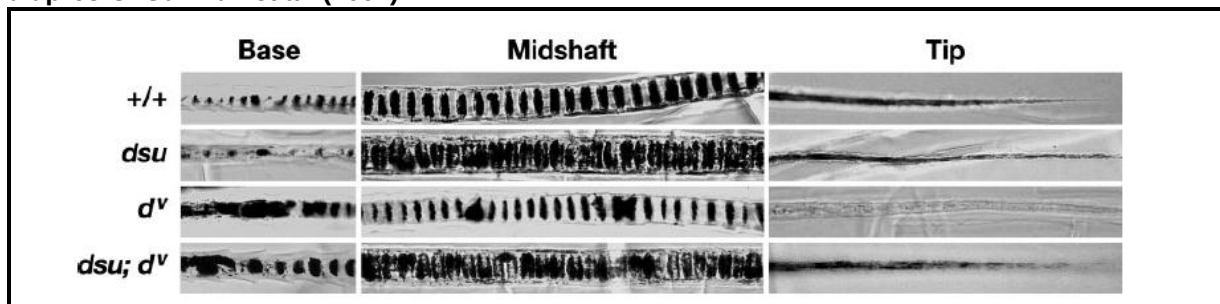
Le gène *MREG* code une petite protéine de 214 acides aminés (28 kDa) dont la séquence est hautement conservée entre les humains et les souris. Des analyses immunohistochimiques de l'épithélium pigmentaire rétinien ont permis à Rachel *et al.* (2012) de localiser la mélanoréguline non dans les mélanosomes mais dans de petites vésicules de moins de 100µm présentes dans le cytoplasme de l'épithélium pigmentaire de la rétine, cohérent avec un rôle pour *MREG* de régulation des interactions entre les membranes durant la biogenèse des mélanosomes.

g.4) Impact de dsu sur la répartition des pigments au sein du poil (O' Sullivan et al., 2004)

O' Sullivan *et al.* (2004) ont également étudié l'impact de *dsu* sur la répartition des pigments le long des poils. Ils ont pour cela étudié des poils de souris sauvages, *dsu*, d^v et dsu/d^v . Vingt poils de chaque génotype ont été examinés à l'aveugle et notés selon trois segments : la base, la partie intermédiaire et le sommet. La base du poil a été notée selon la présence ou l'absence d'amas de pigments. Dans la partie intermédiaire c'est l'espacement des bandes de pigments qui a été noté ainsi que la présence ou l'absence d'amas de pigments. A l'extrémité, les pigments ont été quantifiés visuellement et notés de – à +++ en fonction de l'intensité de la coloration.

La figure 42, tirée de la publication de O' Sullivan *et al.* (2004) illustre les résultats obtenus.

Figure 42 : Poils de souris sauvage, *dsu*, *dilute*, et *dilute/dsu* en microscopie électronique, d'après O' Sullivan *et al.* (2004)



O' Sullivan *et al.* ont obtenu les résultats suivants :

- Dans le poil de souris sauvage, le pigment est incorporé de façon régulière et s'étend jusqu' à l'extrémité du poil.
- Le poil de souris d^v/d^v présente des amas à la base du poil et dans la partie intermédiaire mais l'espacement des bandes de la partie intermédiaire est normal. Il n'y a pas de pigments à l'extrémité du poil comparé au poil de souris sauvage. Des études menées par Russell (1948) sur des poils de souris d^v ont montré qu'ils ne contenaient pas moins de pigments que les souris de type sauvage. Cependant c'est cette disposition en amas des pigments qui impacte sur l'absorption de la lumière et fait que la couleur paraît moins intense chez une souris de couleur diluée que chez une souris de couleur non diluée (Russell, 1948).
- Un poil de souris *dsu/dsu* non porteuse de la dilution présente un espacement des bandes plus petit que chez un individu sauvage et possède des pigments en partie terminale. On ne distingue pas d'amas à la base du poil ni dans sa partie intermédiaire.
- Le double mutant *dsu/dsu, d^v/d^v* a moins de pigments à l'extrémité du poil que le mutant *dsu/dsu* mais en possède contrairement au mutant d^v/d^v . Les amas de pigments sont par contre toujours présents à la base du poil et dans sa partie intermédiaire comme chez les souris d^v/d^v . Le poil de souris *dsu/dsu* présente un espacement des bandes plus petit que chez l'individu sauvage. Ceci combiné à la présence de pigments à l'extrémité du poil rend la couleur de la robe des souris *dsu/dsu, d^v/d^v* plus sombre que la robe des souris d^v/d^v .

g.5) Modes d'action et fonctions de la mélanoréguline et de sa mutation

Bien que les mécanismes par lesquels la mutation au locus *dilute suppressor* agit soient encore partiellement inconnus et sujets à controverse, ils permettent de compenser la perte de la myosineVa codée par *dilute* (Moore *et al.*, 1988b). En d'autres mots, la dilution de couleur résultant du manque de myosineVa est compensée par le manque d'expression de la mélanoréguline, produit du gène *MREG*.

Contrairement aux hypothèses initiales, le gène *MREG* ne coderait pas une protéine motrice capable de compenser la perte de la myosineVa dans le complexe MyosinVa-RAB27-MLPH. La mélanoréguline semble plutôt affecter la pigmentation

en modifiant la motilité des mélanosomes par un mécanisme indépendant de la myosine Va.

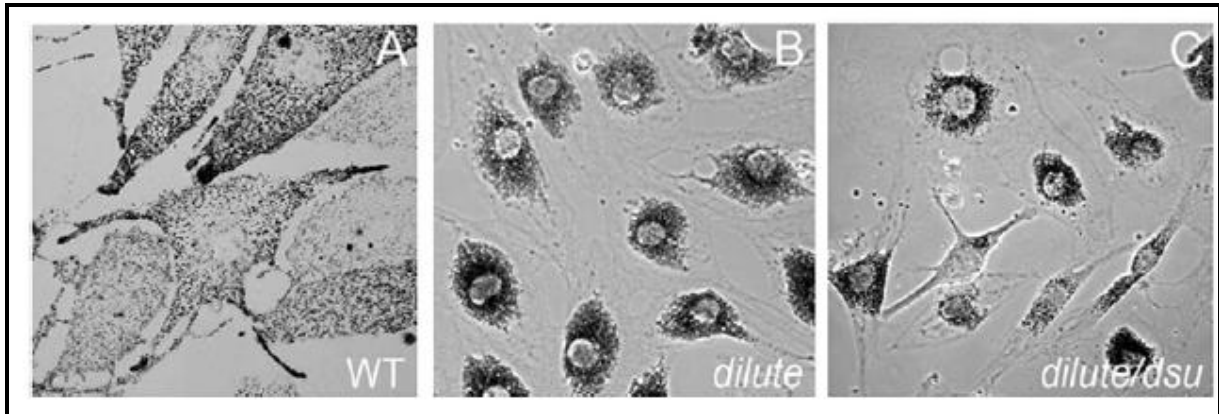
Dans l'albinisme de type 1 lié à OA1 et le HPS lié à BLOC-2, on constate de nombreux dysfonctionnements dans l'aspect des organites, notamment des mélanosomes. Ainsi chez les individus atteints d'OA1 les mélanosomes sont en petits nombres et de grande taille (macromélanosomes), alors que chez les individus présentant un HPS, les mélanosomes sont plus petits que la normale. Rachel *et al.* (2012) se sont servis de ces données pour établir le rôle du gène *MREG* dans le maintien de la taille et de la distribution des mélanosomes. Ils ont constaté qu'une mutation perte de fonction de *MREG* facilite l'augmentation de taille des micromélanosomes de la choroïde chez des patients HPS mutants pour le complexe BLOC-2, mais également qu'une souris transgénique surexprimant *MREG* et invalidée pour OA1 (OA1^{ko/ko}) présente une correction de la taille des macromélanosomes de l'épithélium pigmentaire rétinien. La relation réciproque entre le taux d'expression de la mélanoréguline et la taille des mélanosomes suggère que cette protéine peut agir comme un régulateur négatif de la fusion des membranes, en agissant directement lors du processus de fusion ou indirectement en facilitant le transport des vésicules. La mélanoréguline pourrait agir de concert avec les complexes BLOC transportant les vésicules vers les mélanosomes précoces, en empêchant ces vésicules de transport de fusionner avec les organites en développement dans certaines conditions, telles que la taille des mélanosomes ou la quantité de certaines protéines. La mélanoreguline peut servir de molécule de liaison entre le complexe BLOC 2 et OA1, dont il a été montré qu'il régulait le trafic des protéines des mélanosomes dans les premiers stades de leur biogenèse (Giordano *et al.*, 2009).

Bien que le mécanisme exact de transfert intercellulaire des pigments (mélanocyte-kératinocyte) soit encore l'objet de nombreuses hypothèses, un transfert efficace requiert la production de mélanosomes contenant les pigments qui sont ensuite transportés du centre du mélanocyte vers l'extrémité des dendrites où a lieu le transfert. Dans les mélanocytes des souris *dilute* qui ne contiennent pas de myosineVa fonctionnelle, ce transport ne peut s'effectuer de façon efficace et les liens entre mélanosomes et filaments d'actine n'ont plus lieu. La distribution des mélanosomes est alors uniquement due aux trafic le long des microtubules. Le résultat de cette redistribution est l'accumulation prononcée des mélanosomes en région périnucléaire et vers le centre du mélanocyte à l'opposé de sa distribution habituelle en périphérie de cellule.

De façon surprenante, il a été montré que la couleur de robe restaurée par *dsu* a lieu sans restauration de la distribution périphérique normale des mélanosomes, suite à l'observation des mélanocytes présents dans la glande de Harder de souris *dilute* et *dsu*. Ces mélanocytes présentaient une accumulation centrale des mélanosomes indistinguishable de ceux des souris *dilute*. (O'Sullivan *et al.*, 2004). La figure 43

présente les images en microscopie électronique obtenues par Wu *et al.* (2012) et qui illustrent ces résultats.

Figure 43: Répartition des mélanosomes au sein des mélanocytes chez des souris sauvages, des souris *dilute* et des souris *dilute/dsu*, images en microscopie, extrait de Wu *et al.* (2012)

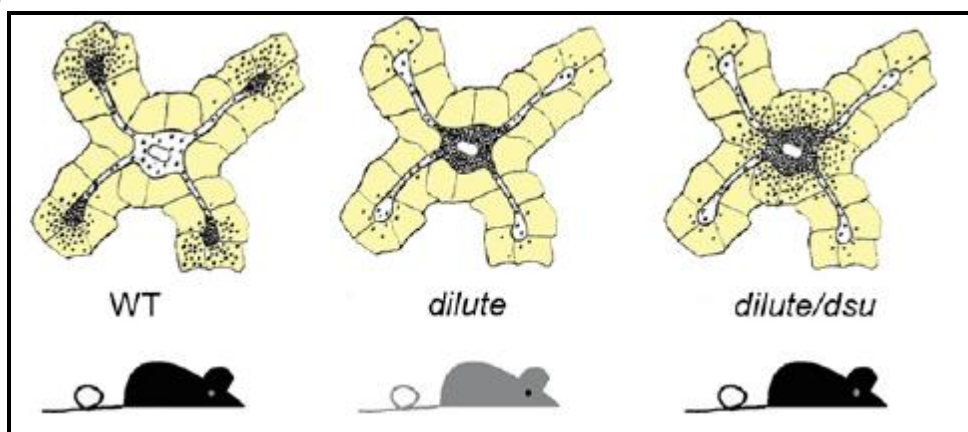


Dsu ne restaure pas (illustration C) la distribution périphérique des mélanosomes observée chez la souris *wild type* WT en A. La distribution des mélanosomes est similaire chez la souris *dilute* et la souris *dilute/dsu*.

Ces observations sont en désaccord avec le mécanisme accepté que l'accumulation des mélanosomes en périphérie des mélanocytes dans leurs dendrites est un prérequis indispensable à leur transfert.

Wu *et al.* (2012) ont également montré, grâce à des techniques d'imagerie par fluorescence, que les mélanosomes peuvent sortir des mélanocytes vers les kératinocytes voisins dans le cas des souris *dsu* mais extrêmement peu dans le cas de souris *dilute*, comme illustré sur la figure 44.

Figure 44: Répartition des mélanosomes au sein d'une unité de pigmentation, extrait de Wu *et al.* (2012)



WT (*wild type*): souris sauvage

Ce constat est cohérent avec l'observation microscopique effectuée par O' Sullivan *et al.* (2004) qui mettaient en évidence le nombre accru de pigments dans la partie centrale et l'extrémité des poils de souris *dilute/dsu* par rapport aux souris *dilute*. Wu

et al. (2012) ont de plus quantifié que sept fois plus de pigments étaient transférées chez les souris *dilute/dsu* par rapport aux souris *dilute*.

Par une technique d'imagerie vidéo en temps réel, Wu *et al.* (2012) ont décrit les mécanismes par lesquels le transfert des mélanosomes s'effectue des mélanocytes aux kératinocytes chez les souris *dilute* et *dilute/dsu*, chez lesquelles les pigments ne sont pas accumulés dans les dendrites.

Trois étapes essentielles ont été mises en évidence :

- l'adhérence apparente entre les prolongements dendritiques du mélanocyte et les kératinocytes l'environnant,
- l'excrétion en deux temps avec tout d'abord un amincissement de la dendrite du côté où va avoir lieu la rupture puis l'excrétion en elle-même d'une membrane plasmique contenant de nombreux mélanosomes,
- la phagocytose de la vésicule contenant les mélanosomes par les kératinocytes.

Récemment, Ohbayashi *et al.* (2012b) ont montré que la mélanoréguline fonctionnerait comme un récepteur cargo pour le complexe moteur dynéine-dynactine dans les portions terminales des microtubules pour le transport des mélanosomes (Ohbayashi *et al.*, 2012b). Elle interagirait directement avec le domaine C-Terminal de RILP pour former un complexe avec RILP et p150^{Glued}, lequel est analogue au complexe de transport retrograde RAB7-RILP-p150^{Glued} (Jordens *et al.*, 2001 ; Cantalupo *et al.*, 2001). Ainsi un *knock down* de chaque composant du complexe MREG-RILP-p150^{Glued} restaurerait la distribution périphérique des mélanosomes dans les mélanocytes RAB27A déficients (Ohbayashi *et al.*, 2012b). Ces découvertes vont à l'encontre des théories de Wu *et al.* (2012) pour qui *dsu* ne permettrait pas de restaurer la distribution périphérique des mélanosomes.

D- Transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes

a) Mécanismes de transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes

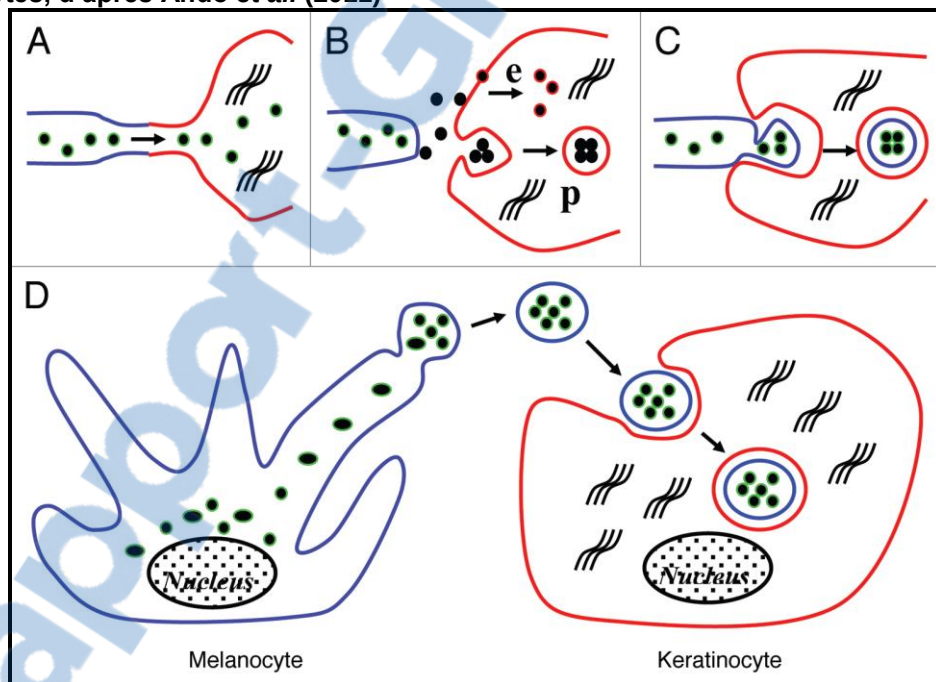
Les mélanocytes sont stimulés par des facteurs paracrines, dont l' α MSH (*melanocyte stimulating hormone*), l'endothéline 1 et les prostaglandines qui sont sécrétées par les kératinocytes environnant (Scott *et al.*, 2002). Cette stimulation aboutit à la formation des dendrites et au transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes voisins et aux cellules de la matrice du poil grâce à une réorganisation de leur cytosquelette et de leur membrane (Van den Bossche *et al.*, 2006). Chaque dendrite d'un mélanocyte est capable de fournir en mélanine approximativement 36 kératinocytes (Fitzpatrick et Breathnach, 1963). L'interaction entre ces deux types cellulaires met en jeu de multiples protéines d'adhésion créant un contact intime qui,

par analogie aux synapses neuronales ou immunologiques, est appelé synapse pigmentaire (Van den Bossche *et al.*, 2006). L'une des étapes précédant le transfert est la mobilisation des mélanosomes sous la membrane plasmique, aux extrémités dendritiques selon les mécanismes étudiés dans la partie précédente.

Bien que les mécanismes précis de transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes restent encore à élucider, de nombreuses théories ont été proposées (Van den Bossche *et al.*, 2006) :

- la fusion directe des membranes plasmiques avec transfert des mélanosomes par des nanotubes établis entre mélanocytes et kératinocytes (figure 45.A),
- l'exocytose des mélanosomes dans l'espace extracellulaire et leur absorption ultérieure par les kératinocytes par phagocytose (figure 45.B),
- la cytophagocytose de l'extrémité des dendrites du mélanocyte par les kératinocytes (figure 45.C),
- un transfert médié par des vésicules membranaires contenant les mélanosomes et quittant le mélanocyte par exocytose pour entrer dans le kératinocyte par endocytose (figure 45.D).

Figure 45 : Mécanismes supposés de transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes, d'après Ando *et al.* (2011)



A : Fusion directe des membranes plasmiques ; **B** : Exocytose puis phagocytose des mélanosomes ; **C** : Cytophagocytose de l'extrémité de la dendrite par le kératinocyte ; **D** : Transfert des mélanosomes entre le mélanocyte et le kératinocyte médié par des vésicules de transport

a.1) La fusion des membranes plasmiques

Dans ce modèle, proposé en 1979 par Garcia *et al.*, les mélanocytes et les kératinocytes fusionnent leurs membranes plasmiques par l'intermédiaire d'un pore ou d'un canal à travers lequel les mélanosomes sont transportés. Plus récemment, Scott *et al.* (2002) ont montré que le transfert se produit par la fusion d'un filipode avec la membrane du kératinocyte autorisant le passage des mélanosomes. Les

filipodes s'étendent à partir des dendrites et des corps cellulaires des mélanocytes, adhèrent à la surface des kératinocytes voisins et permettent le transport des mélanosomes vers la membrane des kératinocytes.

La protéine CDC42 (*cell division control protein 42*) joue un rôle prépondérant dans la formation de ces filipodes (Scott *et al.*, 2002). Scott *et al.* (2002) ont décrit ces phénomènes de fusion membranaire comme des tunnels de nanotubes. Rustom *et al.* (2004) ont décrit l'existence d'une méthode de communication entre les cellules basée sur les nanotubes, qui pourraient permettre de mettre en réseau diverses cellules pour le transport des organites. La fusion des filipodes avec les cellules voisines aboutit à la formation d'une structure tubulaire de 50 à 200 nanomètres de diamètre directement connectée au cytoplasme des cellules. Le tube est constitué de filaments d'actine et permet un transport unidirectionnel des organites (Van den Bossche *et al.*, 2006).

a.2) L' exocytose par les mélanocytes et la phagocytose par les kératinocytes

L'exocytose est un processus dans lequel les membranes des organites cytoplasmiques fusionnent avec la membrane plasmique en réponse à une stimulation. Dans cette hypothèse, le transfert de la mélanine est réalisé par fusion de la membrane mélanosomale avec la membrane plasmique des mélanocytes. La mélanine, extracellulaire, est alors phagocytée par un kératinocyte voisin. En faveur de cette hypothèse, Scott et Zhao (2001) ont constaté que les mélanocytes expriment des molécules ayant un rôle bien connu dans l'exocytose comme les protéines SNARE et les RAB GTPases.

Les SNAREs comprennent trois familles de protéines associées aux membranes et qui jouent un rôle dans les événements de fusion membranaire : la famille des synaptobrevines, également appelée VAMP, la famille des syntaxines et la famille des SNAP-25. Ces protéines s'associent en complexes ; le plus souvent SNAP25 et la syntaxine sont situées sur la membrane plasmique et lient VAMP qui se situe sur la membrane de la vésicule (Van den Bossche *et al.*, 2006).

Les protéines de la famille des RAB GTPases jouent également un rôle dans la fusion membranaire, en particulier dans l'attachement et l'amarrage des membranes avant leur fusion effective. Les RAB3 et plus particulièrement la RAB3A-d sont les protéines RABs centrales intervenant dans la régulation de l'exocytose (Araki *et al.*, 2000).

La *synaptotagmine-like protein2-a* (SLP2-a) est un effecteur de RAB27a qui a été découvert dans les mélanocytes (Kuroda et Fukuda, 2004). Il a été montré qu'il relie RAB27a avec la phosphatidylsérine présente dans les membranes plasmiques, fixant ainsi les mélanosomes. RAB27a joue donc également un rôle essentiel dans l'amarrage des mélanosomes à la membrane plasmique (Van den Bossche *et al.*, 2006).

Un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de l'exocytose des mélanosomes a été apporté par Potter et Medenica (1968) qui ont montré que la

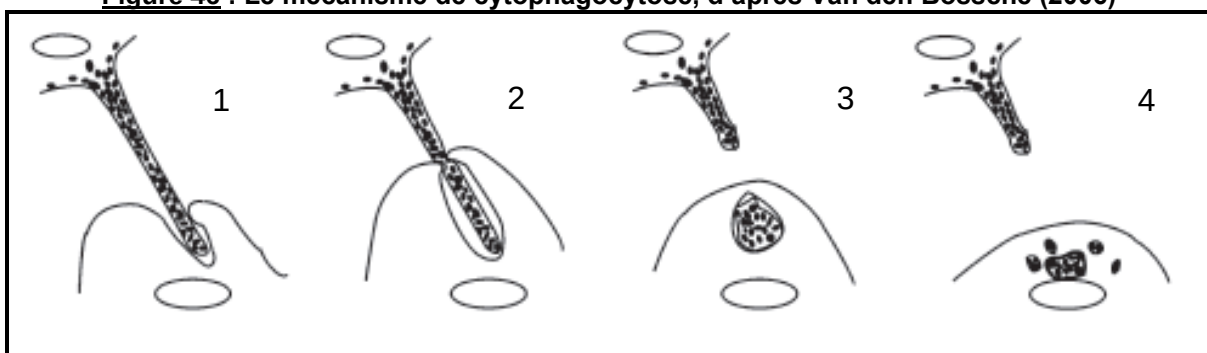
mélanine est présente de façon similaire dans les kératinocytes, qu'elle ait été fournie de manière exogène ou par les mélanocytes.

a.3) La cytophagocytose

La phagocytose est définie comme la capture et l'ingestion par des cellules de particules ayant un diamètre supérieur à 0,5 nm. Chez les mammifères, elle sert essentiellement dans les processus de défense contre les agents pathogènes ainsi que dans l'élimination des cellules endommagées ou sénescents. Elle est habituellement réalisée par des cellules spécialisées telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes. Des cellules non spécialisées sont également capables de phagocytose mais avec une cinétique beaucoup plus lente. En outre, ces cellules sont moins mobiles et leur domaine de phagocytose est donc limité à leur environnement proche (Rabinovitch, 1995). Les kératinocytes appartiennent à ce dernier groupe. Leur nature phagocytaire a été démontrée à la fois *in vitro* (Blois, 1968) et *in vivo* (Potter et Medenica, 1968).

Le mécanisme de transfert de la mélanine par phagocytose est décrit comme étant l'ingestion de l'extrémité dendritique du mélanocyte par le kératinocyte, comme illustré sur la figure 46. Tout d'abord, le mélanocyte étend ses dendrites vers le kératinocyte et rentre en contact avec ce dernier. Le kératinocyte engloutit alors l'extrémité dendritique à l'aide de villosités qui peuvent être qualifiées de projections cytoplasmiques. Dans un deuxième temps, l'extrémité de la dendrite est pressée et arrachée par pincement. Il en résulte la formation d'une poche cytoplasmique emplie de mélanosomes. Enfin, le phagolysosome, formé par la fusion de lysosomes et de cette poche cytoplasmique, est désintégré en petites vésicules contenant des granules de mélanine qui sont ensuite dispersées dans le cytoplasme (Okasaki *et al.*, 1976).

Figure 46 : Le mécanisme de cytophagocytose, d'après Van den Bossche (2006)



1 : Extension des dendrites du mélanocyte vers le kératinocyte ; 2 : Le kératinocyte engloutit l'extrémité dendritique ; 3 : Extrémité de la dendrite arrachée par pincement ; 4 : Formation d'une poche cytoplasmique remplie de mélanosomes dans le kératinocyte.

a.4) Le transfert médié par vésicules

Les études de Cerdan *et al.* (1992) ainsi que de Aspengren *et al.* (2006) suggèrent que le transfert de la mélanine des mélanocytes vers les kératinocytes pourrait

s'effectuer par l'exocytose de vésicules membranaires contenant les mélanosomes et leur phagocytose dans un deuxième temps par les kératinocytes.

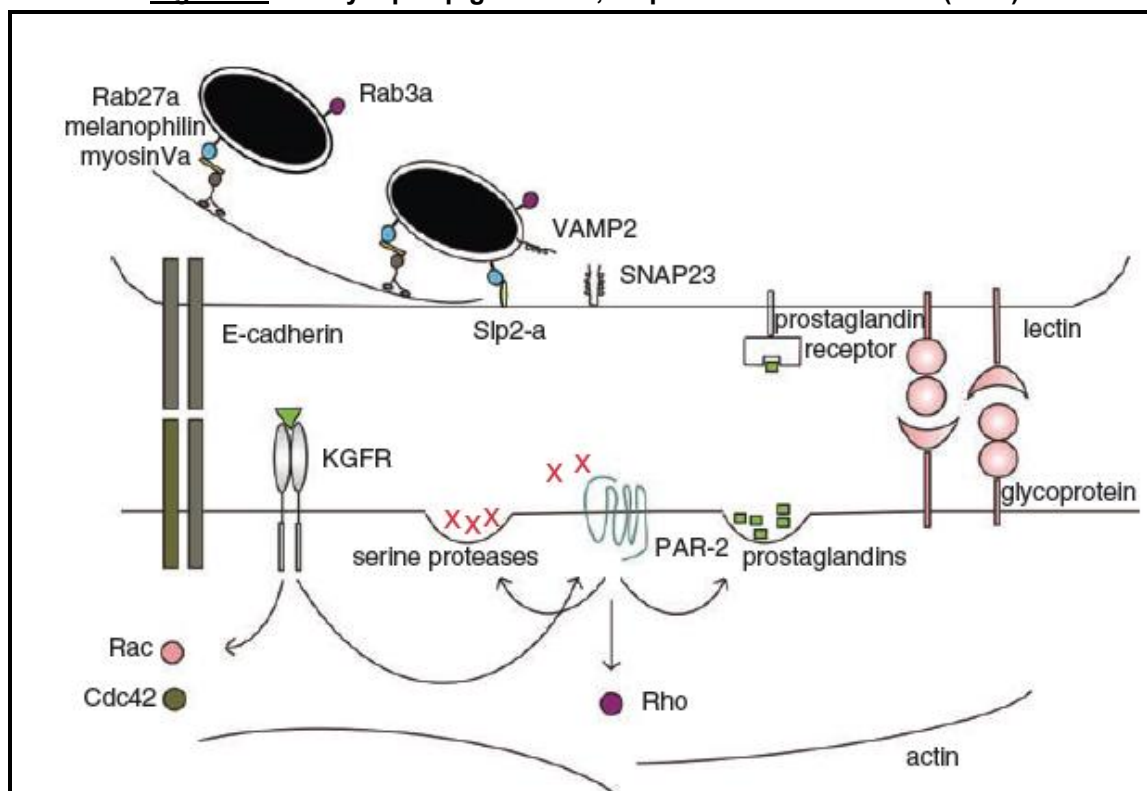
a.5) Bilan (Van den Bossche et al., 2006)

Aucune des hypothèses présentées à ce jour ne peut être considérée comme unique et universelle. La phagocytose semble être une étape nécessaire au processus de transfert des mélanosomes. Il pourrait s'agir de phagocytose soit de mélanine libérée par exocytose ou de cytophagocytose de l'extrémité d'une dendrite ou enfin de la phagocytose d'une vésicule qui a été sécrétée par le mélanocyte et qui contient des mélanosomes. Naturellement, ces mécanismes ne s'excluent pas mutuellement. Un quatrième mécanisme possible est la fusion des membranes plasmiques, qui, le cas échéant, joue sans doute un rôle secondaire car il ne fait pas appel au processus de phagocytose.

b) Molécules impliquées dans le transfert des mélanosomes

Le transfert des mélanosomes est soumis à l'action de diverses molécules dont les plus importantes sont les protéines RAB, les protéines SNAREs, les cadhérines, les lectines ainsi que les RHO GTPases (*Ras homologous GTPases*). La figure 47 présente les molécules impliquées lors du transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes.

Figure 47 : La synapse pigmentaire, d'après Van den Bossche (2006)



Modèle hypothétique de la synapse pigmentaire représentant les molécules avec un rôle établi dans le transport ou le transfert (PAR-2 et ses effecteurs en aval, le complexe RAB27-MLPH-MyosinVa, SLP2-a et les lectines) et les molécules avec un rôle encore supposé : les E-cadhérines, les protéines SNARES et les protéines RAB médiant la fusion de la membrane mélanosomale avec la membrane plasmique.

RAB : Ras-related proteins in brain ; **VAMP** : Vesicle associated membrane protein ; **SNAP** : Synaptosomal-associated protein ; **Slp2-a** : Synaptotagmine-like protein 2-a ; **KGFR** : Keratinocyte growth factor receptor ; **PAR-2** : Protease-activated receptor-2; **Rac** : Ras activator ; **Cdc-42** : Cell division control protein 42 ; **Rho** : Ras homologous

b.1) Protéines Rab régulant la formation des dendrites des mélanocytes

Quel que soit le mécanisme de transfert des mélanosomes, la formation des dendrites est une étape cruciale au cours de laquelle interviennent des protéines RAB.

La famille de GTPases RHO (RAC (*Ras activator*), RHO (*Ras homologous*) et CDC42 (*cell division control protein 42*)) joue un rôle central dans la dynamique du cytosquelette, y compris dans la polymérisation des filaments d'actine et la régulation de la formation des dendrites (Luo, 2000). Des taux élevés d'AMPc induisent une activation des RAC et une inhibition des RHO dans de nombreuses variétés de cellules ; ainsi il a été montré que l'expression d'un mutant constitutif actif RAC (V12RAC) ou d'un inhibiteur RHO (*RHO*GDP dissociation inhibitor) est capable de stimuler la formation des dendrites dans les mélanocytes (Scott et Leopardi, 2003). Ohbayashi *et al.* (2012c) ont mis en évidence l'implication des médiateurs membranaires RAB dans la formation des dendrites des mélanocytes en analysant le domaine VPS9 (*vacuolar sorting protein 9*) de la protéine VARP (*VPS9-ankyrin*

repeat protein). VARP se lie à RAB32/38 via le domaine de liaison ANKR1 (*ankyrin*) permettant le transport de TYRP1 jusqu' aux mélanosomes. L'activité RAB21-GEF (*RAB21-guanine nucleotide exchange factor*) du domaine VPS9 de VARP n'est pas requise pour ce procédé (Tamura *et al.*, 2011). Par contre l'activité RAB21-GEF de VARP (ou RAB21 lui-même) est requise pour la formation des dendrites dans les cultures mélanocytaires mais pas les protéines RAB32/38 (Ohbayashi *et al.*, 2012c). Ainsi, VARP régule deux étapes distinctes dans le processus de mélanogenèse : le transport des enzymes mélanogéniques et la formation des dendrites, à travers deux domaine de signalisation RAB : le domaine ANKR1 (domaine de fixation à RAB32/38) et le domaine VPS9 (activité RAB21-GEF).

En plus de ces deux domaines, VARP possède un domaine d'interaction VAMP7/TI-VAMP (VID) entre les domaines ANKR1 et ANKR2 (Burgo *et al.*, 2009). VID est requis pour la formation des dendrites ainsi que pour le transport des enzymes mélanogéniques (Tamura *et al.*, 2011 ; Ohbayashi *et al.*, 2012c).

b.2) PAR-2

La famille de récepteurs activés par les protéases (PAR-1-PAR-4) se compose de récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G activés par les protéases à sérine qui clivent le domaine amino-terminal extracellulaire (Van den Bossche *et al.*, 2006). Seiberg (2001) a mis en évidence le rôle de PAR-2 dans le transfert de la mélanine des mélanocytes aux kératinocytes. La stimulation de ce récepteur améliore le taux de phagocytose des kératinocytes et tend à augmenter le transfert de mélanine ; PAR-2 a ainsi été mis en évidence comme étant un récepteur majeur dans les processus de phagocytose (Sharlow *et al.*, 2000). Cependant, le transfert de la mélanine n'est pas complètement inhibé par un traitement avec des inhibiteurs des protéases à sérines (Seiberg *et al.*, 2000). Il y a donc d'autres molécules clés jouant un rôle dans la phagocytose ou, comme nous l'avons vu, un autre mécanisme impliqué.

b.3) Les molécules d'adhésion : les cadherines et les lectines

La mise en place de la synapse pigmentaire implique également l'existence de molécules permettant l'adhésion des mélanocytes aux kératinocytes. Ces molécules sont principalement les cadhérines et les lectines. Les cadhérines constituent une famille de glycoprotéines situées à la surface des cellules et qui se lient aux molécules d'adhérence cellulaire des autres cellules. Elles ne peuvent jouer leur rôle qu' en présence d' ions calcium. La E-cadhérine et la P-cadhérine sont exprimées dans les mélanocytes humains et toutes deux médient l'adhésion des mélanocytes aux kératinocytes. La P-cadhérine semble jouer un rôle mineur par rapport à la E-cadhérine qui est le médiateur principal dans l'adhérence mélanocyte-kératinocyte (Tang *et al.*, 1994).

Par analogie avec la synapse phagocytaire, la synapse pigmentaire contient également des lectines. Les lectines sont des protéines qui lient spécifiquement et de façon réversible certains glucides. Elles interviennent au niveau de la reconnaissance entre les cellules (Stuart et Ezekowitz, 2005).

III- Régulation de la mélanocyto-genèse et de la mélanogenèse

La production de mélanine est le résultat d'un réseau complexe impliquant des facteurs paracrines sécrétés par les kératinocytes (dont le plus important est l' α -MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) codée par le gène de la pro-opiomélanocortine (*POMC*)), ainsi que les récepteurs spécifiques de ces facteurs, MC1R (*melanocortin 1 receptor*), EDNRB (*endothelin receptor type B*) et le récepteur à la tyrosine kinase c-Kit (Corre et Galibert, 2006) Ce réseau implique également plusieurs facteurs de transcription dont le principal est *MITF* (*Microphthalmia associated transcription factor*) ainsi que des gènes impliqués directement dans la synthèse du pigment, tels que les gènes codant la tyrosinase, *TYRP1* et *TYRP2* (Kadekaro et al., 2003).

a) Régulation génétique

a) Vue d'ensemble de la régulation génétique de la mélanocyto-genèse et de la mélanogenèse

Lors de l'embryogenèse et en période post-natale, les mélanoblastes expriment une série de gènes de développement. Ces gènes appartiennent à deux catégories : des gènes codant des facteurs de transcription et des gènes intervenant dans des voies de signalisation impliquées dans une communication inter-cellulaire. Ils peuvent jouer un rôle dans la survie des cellules du lignage mélanocytaire, leur différenciation en mélanocytes, la synthèse des différentes mélanines ou encore la maturation et le transfert des mélanosomes.

Le principal gène régulant l'ensemble de ces processus est le gène codant le facteur de transcription *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*) dont une des fonctions est de réguler l'expression des principaux acteurs de la mélanogenèse tels que *TYR*, *TYRP1*, *TYRP2*, *MART-1* (*Melanoma-associated antigen recognized*) (Goding, 2000) et *PMEL17* (Du et al., 2003).

Outre *MITF*, les principaux gènes impliqués dans la régulation de la pigmentation sont les gènes codant les facteurs de transcription *PAX3* (*paired box gene 3*) et *SOX10* (*SRY-box containing gene 10*) ainsi que des gènes intervenant dans les voies de signalisation du récepteur à activité tyrosine-kinase KIT et celle du récepteur EDNRB (*endothelin receptor type B*) (Steingrimsdottir et al., 2004). Ces facteurs de transcription interagissent de façon complexe, ce qui est abordé par la suite.

Le récepteur à la tyrosine kinase KIT situé à la surface des mélanocytes et son ligand le SCF (*stem cell factor*) produit par les kératinocytes, sont impliqués dans la prolifération et la survie des mélanoblastes. Enfin le récepteur EDNRB et son ligand, l'endothéline 3, semblent intervenir dans la différenciation et la survie mélanocytaire (Ohbayashi et Fukuda, 2012a).

La mélanocyto-genèse consiste donc en une suite d'étapes complexes faisant intervenir de nombreux gènes. Cette fonction peut être modifiée sans provoquer la

mort de l'individu. Dans le tableau 7 issu de Reissmann et Ludwig (2013), les principaux gènes intervenant au cours de la mélanocytogenèse et responsables de mutations de couleurs sont listés. Les symptômes qu'ils entraînent lorsque c'est le cas s'ils sont mutés ainsi que l'espèce et la couleur sont également précisés.

Tableau 7: Principaux gènes intervenant dans la mélanocytogenèse à l'origine de mutations de la couleur des robes chez les mammifères, Reissmann et Ludwig (2013)

Gene	Name	Pleiotropic effects	Species	Hair/skin colour	Eye colour
<i>ASIP</i> <i>ASIP</i>	Non-agouti Lethal yellow, viable yellow, lethal non-agouti	Behaviour Obesity, hyperglycemia, hyperinsulinemia, increased susceptibility to hyperplasia, carcinogenesis	Deer mice Mouse	No stripping Yellow	Dark
<i>ATRN</i>	Mahogany	Influence on obesity	Mouse	Darkening	–
<i>EDN3</i>	Lethal spotting	Aganglionic megacolon, lethal	Mouse	White spotting	Dark
<i>EDN3</i>	WS4	Congenial megacolon	Human	White hairs/skin patches	Hypopigmentation
<i>EDNRB</i>	Spotting lethal	Aganglionic megacolon	Rat	White with spots	–
<i>EDNRB</i>	OLWS	Aganglionic megacolon, deaf, lethal	Horse	Frame overo spotting	Blue
<i>EDNRB</i>	Piebald spotting	Aganglionic megacolon, lethal	Mouse	White spotting	–
<i>EDNRB</i>	WS4	Congenial megacolon, deaf	Human	White forelock/skin patches	Heterochromia iridis
<i>KIT</i> <i>KIT</i>	Dominant white Dominant white, white spotting	Lethal in utero Macrocytic anaemia, sterility, lethal	Horse Mouse	White White	Dark Black
<i>KITLG</i>	Steel, steel panda	Macrocytic anaemia, sterility, lethal	Mouse	Diluted coat, white spotting, white	Black
<i>LYST</i>	Beige	Accumulation of giant lysosomes, abnormal bleedings	Mouse	Diluted coat	–
<i>LYST</i>	CHS	Immunodeficiency, coagulopathy, progressive neurological dysfunction, hep- atosplenomegaly	Human	Silvery hair, pale skin	Light
<i>LYST</i>	Aleutian	Immunologic deficiency, abnormal neutrophils	American mink	Diluted greyish coat	–
<i>LYST</i>	CHS	Increased bleeding tendency, abnormal granules	Cattle	Light coat, partial albinism	–
<i>MCOLN3</i>	Varitint-waddler	Lethal, deaf,	Mouse	Pigmentation deficiency	–
<i>MGRN1</i>	Mahoganoid	Influence on obesity	Mouse	Darkening	–
<i>MITF</i> <i>MITF</i>	CCSD Splashed white	Deafness Deafness	Dog Horse	White spotting Extended white markings, large white blaze	Blue Blue
<i>MITF</i>	German White Fleckvieh syndrome	Deafness, colobomatous	Cattle	White	Heterochromia
<i>MITF</i>	WS2	Hearing impairment, congenital deafness	Human	Patchy depigmentation, hypopigmentation	Pigment disturbance
<i>MITF</i>	Black-eyed white	Microphthalmia, deafness, osteopetrosis	Mouse	White, white spotted	Black, diluted
<i>MYO5A</i>	LFS	Neurological abnormalities, lethal	Horse	Lightened coat	–
<i>MYO5A</i>	Dilute	Neurological disorder, lethal	Mouse	Light	–

Tableau 7 suite: Principaux gènes intervenant dans la mélanocytogenèse à l'origine de mutations de la couleur des robes chez les mammifères, Reissmann et Ludwig (2013)

Gene	Name	Pleiotropic effects	Species	Hair/skin colour	Eye colour
MYO5A	GS1	Neuronal dysfunction	Human	Silvery hair, partial albinism, diluted skin	–
OCA2	Pink-eyed dilution	Abnormal spermiogenesis and angiogenesis	Mouse	Fawn	Light
OCA2	OCA2	Decreased visual acuity, nystagmus, strabismus	Human	Light golden hair, white or pinkish skin	Hazel or brown iris
OSTM1	Grey lethal osteopetrosis	Osteopetrosis, lethal	Mouse	Grey	–
PAX3	Splashed white	Deafness	Horse	Extended white markings, extremely large white blaze	Blue
PAX3	WS1	Deafness, dystopia canthorum	Human	White forelock, premature greying	Heterochromia iridis, blue
PAX3	Splotch	Spina bifida, exencephaly, lethal	Mouse	White spotted belly	–
PMEL	CSD	Deafness	Dog	Merle	Blue
PMEL	MCOA	Eye defects, cysts, pectinate ligament abnormalities	Horse	Silver phenotype	Dark
PMEL	Hypotrichosis	Loss or reduction of hairs	Cattle	Dilution of coat	–
RAB27A	GS2	Defects in immune homeostasis, haemophagocytic syndrome	Human	Silvery grey hair, partial albinism	–
RAB27A	Ashen	Platelet defects	Mouse	Lightened coat	–
RAB38	Ruby	Progressive pulmonary, fibrosis, bleeding diathesis	Rat	Fawn-hooded	Red
RAB38	Chocolate	Thinner RPE and IPR	Mouse	Chocolate	Reduced pigmentation, patches
SLC2A9	Huu locus	Hyperuricosuria and hyperuricemia	Dog	Spot size modified	–
SLC24A5	OA	Eye defects, thinner RPE and IPE	Mouse	No visible influence	Pale
SLC45A2	OCA4	Ocular abnormalities	Human	Hypopigmentation of hair and skin	Diluted
SNAI2	WS2	Hearing loss	Human	–	Heterochromia irides
SNAI2	Slugh	Hyperactivity, circling behaviour, gonadal and hematopoietic defects	Mouse	Diluted coat, white forehead blaze, depigmentation on belly, tail and feet	–
SNPs in coat colour genes	Cancer risk	Melanoma	Human	Divers	–
SOX10	Dominant megacolon	Agangliosis, lethal	Mouse	White head and belly spots	–
SOX10	WS4 (WS2)	Deafness, aganglionic megacolon	Human	White hair, depigmented skin patches	Blue
STX17	Progressive greying with age	Melanoma, vitiligo	Horse	White coat, dark skin	Dark
TRPM1	CSNB	Longer photopic a-wave, greater a-wave, lower b-wave amplitudes	Horse	Leopard complex spotting	Iris dark, but sclera white
TYR	–	Behaviour change	Fox	Paler colour	–
TYR	OCA1	Reduced visual acuity, nystagmus	Human	Type A: white hair, pinkish-white skin	Transparent irisi
TYR	OCA1	Retinal functional abnormalities, photoreceptor loss	Mouse	White, albino	Reddish

b) Le facteur de transcription MITF : protéine centrale de la cascade régulatrice de la pigmentation

b.1) Structure de MITF

Le gène *MITF* couvre 190 kb sur le chromosome 20 chez la souris et le chien (Tsuchida *et al.*, 2009). Il code une protéine de 419 acides aminés et est exprimé dans la peau, le tube digestif, le rein, la rétine et le système nerveux central (Tsuchida *et al.*, 2009). Ainsi, des souris porteuses d'allèles mutés du gène *MITF* présentent notamment une perte des mélanocytes dérivés de la crête neurale ainsi qu'une surdité, et un échec de la différenciation de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Moore, 1995). Le gène *MITF* code pour un facteur de transcription contenant un domaine d'activation de la transcription et un domaine bHLH-LZ qui médie la liaison à l'ADN et la dimérisation. En effet, l'analyse des promoteurs des gènes de la tyrosinase et *TYRP1* a révélé l'existence d'une partie commune de 11 paires de bases, la M box (Lowings *et al.*, 1992), nécessaire à leur expression. De plus, les promoteurs des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* comportent tous trois des sites de liaison sur lesquelles MITF peut se lier (Steingrimsdottir *et al.*, 2004).

b.2) Fonctions de MITF

MITF agit au cours de la mélanocytogenèse lors de la différenciation des mélanoblastes, mais aussi lors de la formation des dendrites, la prolifération et l'apoptose à travers diverses voies et mécanismes (Yamaguchi *et al.*, 2007).

MITF contrôle également la mélanogenèse en activant l'expression des enzymes de synthèse des pigments. Des études ont ainsi montré que les promoteurs du gène *TYR* (Bentley *et al.*, 1994 ; Yasumoto *et al.*, 1994), de *TYRP1* (Bertolotto *et al.*, 1998 ; Yasumoto *et al.*, 1997) et de *TYRP2* (Bertolotto *et al.*, 1998) sont activés par MITF.

b.3) Régulation de l'expression de MITF

L'expression du facteur de transcription *MITF* est elle-même régulée par d'autres facteurs de transcription mais aussi par des facteurs environnementaux tels que les UV et par des facteurs sécrétés, entre autres, par les kératinocytes et les fibroblastes selon des mécanismes qui sont abordés par la suite.

- Régulation par les facteurs de transcription *PAX3*, *SOX 10*, *LEF1* et *CREB* (Lin et Fisher, 2007)

Le promoteur *MITF* est régulé en partie par les facteurs de transcription *PAX3* (*paired box gene 3*), *SOX10* (*SRY-box containing gene 10*), *LEF1/TCF* (*Lymphoid enhancer factor*) et *CREB* (*cAMP response element binding protein*) au cours du développement des mélanocytes. Chez l'homme, des mutations affectant la voie MITF conduisent à des défauts de la pigmentation et de l'audition appelés syndromes de Waardenburg.

Les déficits communs à tous les types de syndromes de Waardenburg sont représentés dans le syndrome de Waardenburg de type 2a (WS2a) qui résulte de mutations dans *MITF* (Tassabehji *et al.*, 1994). Les personnes atteintes de WS1 ont

des déformations crâniofaciales et celles atteintes de WS3 peuvent souffrir de malformations des membres. Ces malformations sont dues à diverses mutations de *PAX3* (Tassabehji et al., 1992 et 1993; Baldwin et al., 1994) ce qui suggère un lien entre *MITF* et *PAX3*. En effet Watanabe et al. (1998) ont montré que le promoteur de *MITF* est reconnu par *PAX3* *in vitro* et *in vivo*. De plus, *PAX3* ne régule pas seulement l'expression de *MITF* mais est également impliqué dans la régulation directe de l'expression de *TYRP1* (Galibert et al., 1999).

Les personnes atteintes du syndrome de Waardenburg de type 4 souffrent en plus du syndrome de Hirschsprung (mégacôlon) (Pingault et al. 1998). Des mutations dans *SOX10*, l'endothéline 3 (*ET3*) et son récepteur, *EDNRB*, ont toutes été impliquées dans WS4. Potterf et al. (2000) ont montré que *SOX10* peut réguler l'expression de *MITF* directement. De plus, *SOX10* peut se lier sur le promoteur de *MITF* et activer la transcription jusqu'à 50 fois dans des expériences de transfection. Bien qu'il n'existe aucune preuve d'une interaction directe entre *SOX10* et *PAX3*, la proximité de leurs sites de liaison dans le promoteur de *MITF* soulève la possibilité que les deux protéines peuvent agir en synergie dans l'activation de la transcription au niveau du promoteur *MITF* comme cela a été observé dans les cellules gliales (Kuhlbrodt et al., 1998).

LEF/TCF agit en aval de la voie WNT/ β -caténine (*Wint*) comme un régulateur clé du développement des mélanocytes. La présence d'un signal WNT entraîne une augmentation de la concentration en β -caténine dans la cellule. La β -caténine est transloquée vers le noyau où elle forme un complexe avec les membres de la famille de facteurs de transcription LEF (Lymphoid Enhancer Factor). Comme *SOX10*, les protéines de la famille LEF appartiennent à un groupe de protéine de régulation. La présence de LEF1 seul, sans expression de *WNT* et donc sans β -caténine a un effet répresseur sur *MITF* tandis que le complexe β -caténines/LEF1 augmente son expression. L'expression de *WNT* aurait donc un rôle de dé-répression sur LEF1 (Goding, 2000).

Au bilan, *PAX3* et *MITF* régulent la balance entre le maintien des cellules souches et la différenciation en mélanocytes. Le facteur de transcription *PAX3* joue un rôle important dans le maintien des cellules souches des mélanocytes. Il a été proposé le modèle d'action suivant pour *PAX3* : *PAX3* et *SOX10* activent l'expression de *MITF*, alors que de façon simultanée, *PAX3* empêche *MITF* d'activer *TYRP2*. La protéine *MITF* s'accumule alors et active *TYRP2* dès que sa répression médiée par *PAX3* est levée par la β -caténine activée par la voie WNT (Goding, 2000). Il a été montré qu'un autre membre de la famille des SOX, *SOX 5*, inhibe l'activité stimulatrice de *SOX 10* sur le promoteur de *TYRP2* dans les mélanocytes (Stolt et al., 2008).

- Régulation de *MITF* par l' α MSH

Dans le mélanocyte, la fixation de l' α MSH sur son récepteur MC1R induit l'augmentation du taux d'AMPc par l'intermédiaire d'une protéine G activant à son tour l'adénylcyclase. L'action de l'AMPc est indirecte, elle entraîne une cascade de phosphorylations avec en bout de chaîne la phosphorylation de CREB (*cAMP response element binding protein*) qui se fixe alors sur CRE (*cAMP response element*) et stimule l'expression de *MITF* (Jordan et Jackson, 1998).

L'isolement du promoteur de *MITF* (Fuse *et al.*, 1996) a révélé un élément de réponse à l'AMP cyclique appelé CRE à la position -147 par rapport au site de démarrage de la transcription. Bertolotto *et al.* (1996, 1998) ont montré que l'expression de *MITF* est modulée par le niveau d'AMPc présent dans la cellule. Le signal de l' α MSH peut être antagonisé par la liaison sur le récepteur MC1R de la protéine agouti (Aberdam *et al.*, 1998, Price *et al.*, 1998).

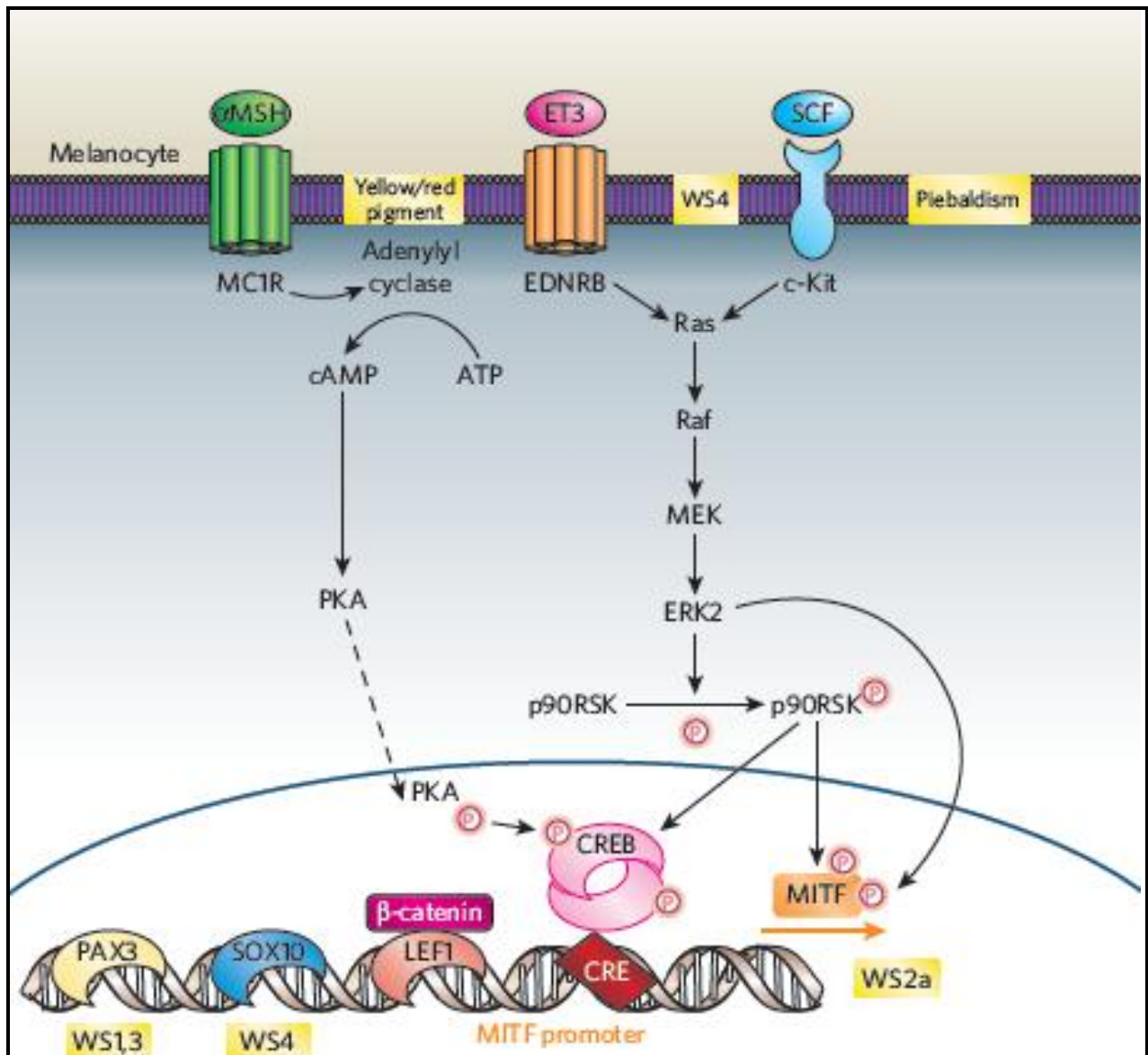
Le promoteur de *MC1R* peut également être régulé directement par *MITF* (Adachi *et al.* 2000), au moins dans les mastocytes, ce qui suggère l'existence d'une boucle de régulation en *feedback* entre *MITF* et *MC1R*.

- Interactions entre *MITF* et les récepteurs c-Kit et EDNRB

La capacité du promoteur de *MITF* à être régulé par CREB en réponse à l'AMPc suggère également que la transcription de *MITF* est stimulée par d'autres signaux qui augmentent la phosphorylation de CREB. Par exemple, dans certains types cellulaires, les récepteurs EGF (*epidermal growth factor*) et NGF (*nerve growth factor*) peuvent induire la phosphorylation de CREB via la famille des MAP kinases ou en réponse au stress via la kinase p38 dépendante MAPKAP-K2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein2*) (Xing *et al.*, 1996 et 1998), qui peut médier l'activation de CREB en réponse au stress et aux radiations UV (Iordanov *et al.*, 1997). La MAP kinase répond également aux signaux produits par EDNRB et KIT (Böhm *et al.*, 1995). D'autres expériences ont montré que la phosphorylation de *MITF* entraînait sa dégradation. c-Kit et *MITF* ont donc des interactions très complexes. Des mutations dans *c-Kit* sont caractérisées chez l'homme par le piébalisme (Jackson, 1994).

La figure 48 récapitule l'ensemble des facteurs intervenant dans la régulation de l'expression de *MITF*. Ils agissent soit de manière directe en se fixant sur le promoteur de *MITF*, soit en entraînant une cascade de phosphorylations qui activent *MITF* directement ou d'autres facteurs de transcription.

Figure 48 : Le promoteur de MITF, d'après Lin et Fisher (2007)



Le promoteur *MITF* est régulé en partie par PAX3, SOX10, LEF1 et CREB durant le développement mélanocytaire. LEF/TCF est en aval de la voie WNT/βcaténine et est un régulateur clé du développement mélanocytaire. La transcription de *MITF* est modifiée par au moins deux autres récepteurs, MC1R et c-Kit.

AMP : cyclic adénosine mono-phosphate; **c-Kit** : Tyrosine protein kinase kit; **CRE** : cAMP response element; **CREB** : cAMP response element binding protein; **EDNRB** : Endothelin receptor type B; **ERK** : Extracellular regulated kinase; **ET3** : Endothéline 3; **LEF1** : Lymphoid enhancer factor; **MC1R** : Melanocortin 1 receptor; **MEK** : Mitogen Activated protein kinase kinase; **MITF** : Microphthalmia associated transcription factor; **PAX3** : Paired box gene 3; **PKA** : Protéine kinase A; **Raf** : Rapidly accelerated fibrosarcoma; **Ras** : Rat sarcoma; **RSK** : Ribosomal S6 kinase; **SCF** : Stem cell growth factor; **SOX10** : SRY-box containing gene 10; **WS** : Waardenburg Syndrome; **αMSH** : α Melanocyte stimulating hormone;

c) Régulation par les voies de signalisation impliquant les récepteurs c- Kit et EDNRB

c.1) KIT (Wehrle-Haller, 2003)

La voie de signalisation KIT/KITL est impliquée dans la migration, la prolifération et/ou la survie de quatre types cellulaires différents : les mélanoblastes issus des crêtes neurales, les cellules hématopoïétiques dont les érythrocytes et les mastocytes, les cellules germinales et les cellules interstitielles de Cajal. Le protooncogène *KIT* code un récepteur trans-membranaire appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le gène *KITL* code le ligand de la protéine KIT, appelée KITL, MGF (*Mast cell Growth Factor*) ou SCF (*Stem Cell factor*). Durant l'embryogenèse, la migration et la localisation des précurseurs des mélanoblastes sont guidées par la voie de signalisation KIT/KITL. En l'absence des protéines KIT ou KITL fonctionnelles (étude de mutants nuls *KIT* de souris), les précurseurs des mélanocytes semblent stopper leur migration et disparaissent peu de temps après. La voie de signalisation KIT/KITL est donc impliquée premièrement dans la migration des précurseurs des mélanocytes, puis dans leur survie.

c.2) EDNRB

Les endothélines appartiennent à une famille de peptides de 21 acides aminés composée de trois membres. Chez la souris, les trois endothélines sont codées par les gènes *EDN1*, *EDN2* et *EDN3* (endothélines 1, 2 et 3). Les endothélines actives se lient à deux récepteurs distincts : EDNRA (Récepteur de type A de l'endothéline) et EDNRB (Récepteur de type B à l'endothéline) qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs sont codés respectivement par les gènes *EDNRA* et *EDNRB* chez la souris. Le couple EDN3 (aussi appelé Et3)/EDNRB est essentiel au développement des mélanocytes et des neurones entériques. Plus précisément, il a été montré, chez la souris, que la voie EDN3/EDNRB était nécessaire à la migration des mélanoblastes (Sato *et al.*, 2008). Enfin la signalisation par les endothélines 1 et 3 active la MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), qui phosphoryle ensuite MITF et stimule également l'expression de *MITF* (Sato *et al.*, 2008).

b) Régulation par des facteurs paracrines

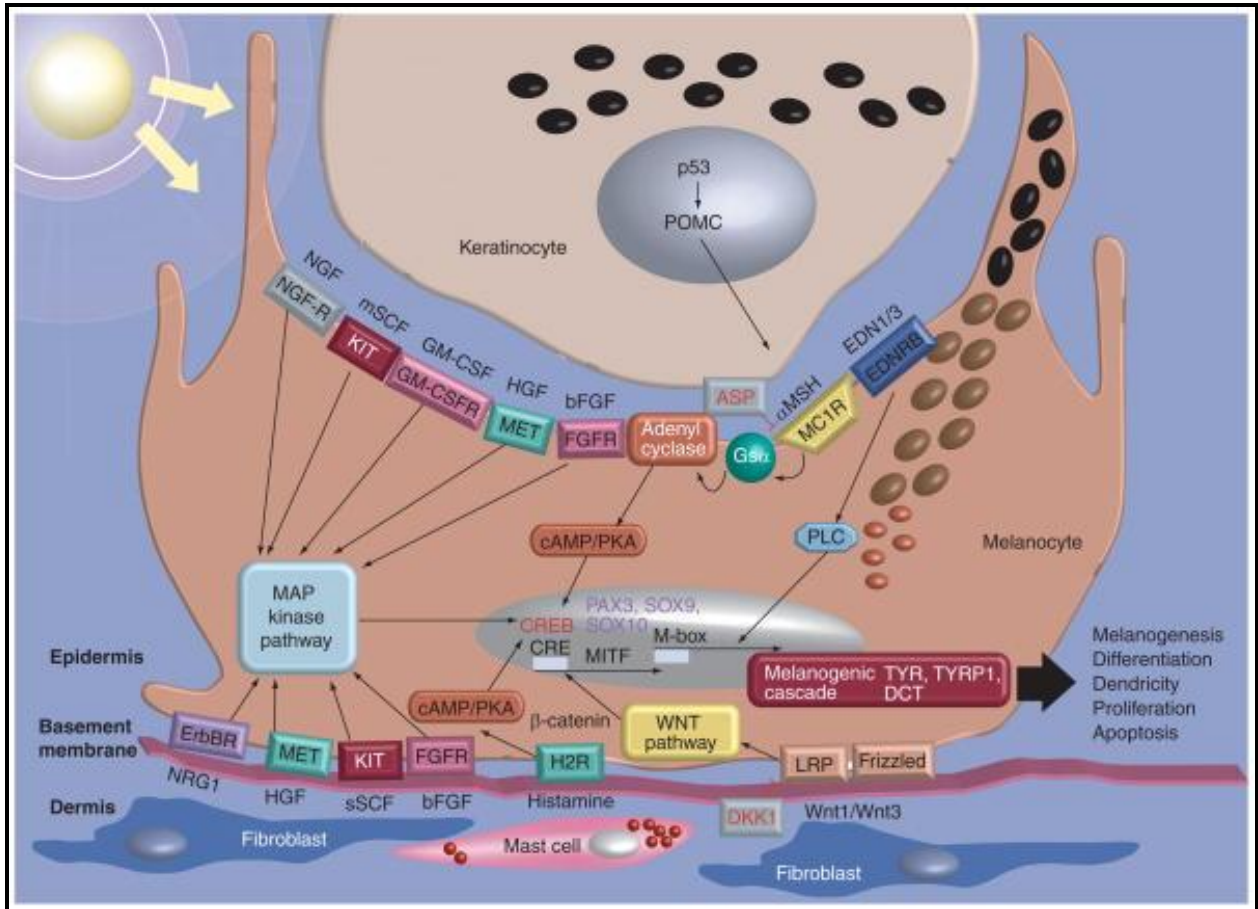
a) Les dérivés de la proopiomélanocortine : rôle central de l' α MSH

La mélanogenèse est régulée hormonalement principalement par l' α MSH et son récepteur MC1R *via* une cascade de signalisation médiée par la PKA (protéine kinase A) et l'AMPc. Le gène *POMC* code un précurseur qui donne l' α MSH, l'ACTH et les β -endorphines. Ce gène est actif principalement dans la glande pituitaire mais les peptides dérivés sont aussi produits dans les kératinocytes et les mélanocytes (Slominski *et al.*, 2004 ; Rousseau *et al.*, 2007). Bien que l' α MSH soit un inducteur

puissant de la pigmentation de la peau des mammifères, le β MSH et l'ACTH possèdent également des activités mélanogéniques (Slominski *et al.*, 2000). Les effets mélanogéniques de l' α MSH et de l'ACTH sont déclenchés par la liaison de ces peptides sur un récepteur couplé à une protéine G, MC1R, dont l'expression est également régulée par les rayons UV. La stimulation du récepteur MC1R active l'adényl cyclase et augmente le taux intracellulaire en AMPc (Suzuki *et al.*, 1996). Cette stimulation de la voie de l'AMPc aboutit *in fine* à la phosphorylation du facteur de transcription CREB et a pour conséquence une augmentation d'expression du facteur de transcription *MITF* dans les mélanocytes (Huber *et al.*, 2003).

La figure 49 illustre les différents acteurs de la voie de régulation utilisant les dérivés de la proopiomélanocortine.

Figure 49 : Les acteurs de la régulation de la mélanogénèse, d'après Kondo et Hearing (2011)



La fixation d' α MSH sur le récepteur MC1R active une voie de signalisation dépendante de la PKA conduisant à la phosphorylation du facteur de transcription CREB et *in fine* à une augmentation d'expression du facteur de transcription MITF. Une autre voie, celle de la MAP kinase, peut également conduire à la phosphorylation du facteur de transcription CREB.

AMP : Cyclic adénosine mono-phosphate; **ASP** : Agouti signaling protein; **bFGF (FGF-R)** : basic fibroblast growth factor (basic fibroblast growth factor receptor); **c-Kit** : Tyrosine protein kinase kit; **CRE** : cAMP response element; **CREB** : cAMP response element binding protein; **DCT** : dopachrome tautomérase; **DKK1** : Dickkopf-related protein 1; **EDN** : Endothéline; **EDNRB** : Endothelin receptor type B; **ErbBR** : = EGFR epidermal growth factor receptor; **GM-CSF (GM-CSFR)** : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor); **H2R** : Histamine H2 receptor; **HGF** : Hepatocyte growth factor; **KIT** : Tyrosine-protein kinase kit; **LRP** : LDL-related protein; **MC1R** : Melanocortin 1 receptor; **MITF** : Microphthalmia associated transcription factor; **NGF (NGF-R)** : Nerve Growth Factor (Nerve Growth Factor receptor) ; **NRG1** : Neuroréguline 1; **p53** : tumor protein 53; **PKA** : Protéine kinase A; **PLC** : Phospholipase C bêta ; **POMC** : Proopiomélanocortine; **SCF** : Stem cell growth factor; **SOX** : SRY-box containing gene; **TYR** : tyrosinase; **TYRP1** : Tyrosinase-related protein 1; **Wnt** : Wingless-int; **α MSH** : α Melanocyte stimulating hormone

b) La protéine agouti

La protéine agouti ASP (*Agouti Signaling Protein*) est un antagoniste de l' α MSH dont la surexpression est à l'origine des mutations *lethal yellow* et *viable yellow* chez la souris. Cette protéine inhibe de manière compétitive le récepteur MC1R et régule à la baisse l'expression du gène *MITF*, et par conséquent ses cibles. Elle induit préférentiellement une synthèse de phaeomélanines au détriment des eumélanines (Aberdam *et al.*, 1998). Il a également été montré *in vitro* que cette protéine bloque la différenciation mélanocytaire ainsi que l'eumélanogénèse induites par l' α MSH (Graham *et al.*, 1997). Une expression élevée de ASP est associée à des bandes jaunes dans les poils de souris. Ainsi, MC1R et ses ligands, l' α MSH et ASP, régulent le *switch* entre la synthèse d'eumélanine et de phaeomélanine dans les mélanocytes (Slominski *et al.*, 2004 ; Hida *et al.*, 2009).

c) DKK1/NRG1

Yamaguchi *et al.*, (2004 et 2008) ont rapporté l'existence de deux facteurs paracrines dérivés des fibroblastes, DKK1 (*dickkopf-related protein 1*) et la neuroréguline 1 (NRG1) qui régulent la mélanogénèse. DKK1, qui est sécrété à haut niveau par les fibroblastes dans le derme des mains et des pieds, supprime la croissance des mélanocytes et inhibe la voie de signalisation WNT/ β caténine.

NRG1, qui est hautement exprimée dans les fibroblastes issus de peaux noires, augmente significativement la pigmentation dans un modèle de peau reconstruite et dans les cultures de mélanocytes humains. NRG1 agit par les récepteur à l'endothéline et mène à l'activation de la signalisation intracellulaire par la voie des MAP kinases pour réguler la mélanogénèse (Choi *et al.*, 2010).

d) Autres facteurs

De très nombreux autres facteurs régulent finement la synthèse des pigments mélaniques et/ou la croissance et la différenciation des mélanocytes. Ainsi le monoxyde d'azote NO mais aussi certains facteurs de croissance, tel que le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), le *stem cell growth factor* (SCF), l'*hepatocyte growth factor* (HGF) et certaines prostaglandines, présentes dans la circulation ou sécrétées par les kératinocytes, agissent sur la croissance mélanocytaire et sur la mélanogénèse.

Les stéroïdes peuvent également influencer la pigmentation (Slominski *et al.*, 2000) et Schallreuter *et al.*, (2009) ont démontré que le cholestérol est capable d'augmenter l'expression de *MITF* et de ses gènes cibles dans les mélanocytes, via une stimulation de la protéine CREB.

c) Régulation par les UV

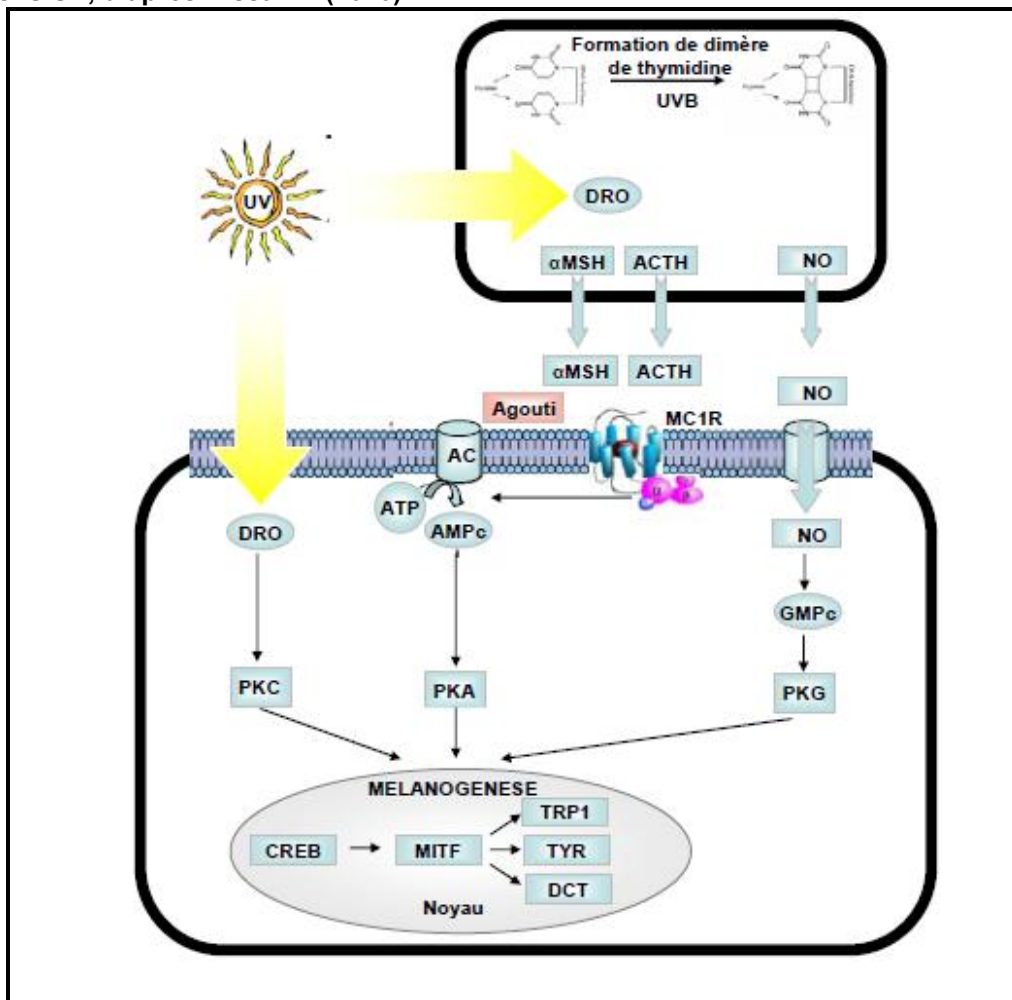
In vivo, la mélanogenèse est également stimulée par les rayons UVA et UVB. Ainsi, en réponse au stress cellulaire engendré par les rayons UV, les mélanocytes répondent en augmentant leur prolifération mais également en stimulant la dendritogenèse afin de transférer davantage de mélanine aux kératinocytes avoisinants et ainsi les protéger. Les rayons UV peuvent agir sur les mélanocytes de manière directe ou indirecte en induisant la sécrétion de facteurs paracrines et autocrines soit par les kératinocytes soit par les mélanocytes eux-mêmes.

a) Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mélanogenèse induite par les UV (Nissan, 2010)

In vitro, l'irradiation de cellules de mélanomes de souris S91 par des UVB a démontré que la stimulation de la mélanogenèse induite par les rayons UV passait par une augmentation de l'activité de la tyrosinase et de son expression (Hill et Hill, 2000). Un certain nombre de voies de signalisation ont été mises en évidence dans la transmission des effets mélanogéniques des rayons UV. La première est la réparation des altérations de l'ADN suite à la formation de dimères de thymidine dans l'ADN des mélanocytes ; la seconde consiste en la production de NO (monoxyde d'azote) et de DRO (dérivés réactifs de l'oxygène).

La figure 50 résume les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mélanogenèse induite par les rayons UV.

Figure 50 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la mélanogénèse induite par les rayons UV, d'après Nissan X (2010)



Les effets des rayons UV activent les voies de la PKA, de la PKC et de la PKG pour stimuler l'expression des facteurs clés de la mélanogénèse MITF, TRP1, TYR et DCT via la phosphorylation de CREB. L'activation de la PKC est induite par la production de radicaux libres (DRO). L'activation de la PKA est induite par la stimulation de la production d'αMSH et d'ACTH par les kératinocytes via l'activation du récepteur MC1R. La voie des PKG est induite par la production de NO.

ACTH : corticostimuline; **AMP** : cyclic adénosine mono-phosphate; **ATP** : Adénosine triphosphate; **CREB** : *cAMP response element binding protein*; **DCT** : dopachrome tautomérase; **DRO** : Dérivés réactifs de l'oxygène; **MC1R** : *Melanocortin 1 receptor*; **MITF** : *Microphthalmia associated transcription factor*; **NO** : Monoxyde d'azote; **PKA** : Protéine kinase A; **PKC** : Protéine kinase C; **PKG** : Protéine kinase G; **TYR** : Tyrosinase; **TYRP1** : *Tyrosinase-related protein 1*; **αMSH** : *α Melanocyte stimulating hormone*

b) Implication de la protéine p38 et du facteur de transcription USF-1

Les UVB en particulier peuvent directement stimuler la mélanogénèse notamment par l'activation du facteur de transcription USF-1 (*upstream transcription factor 1*) via la protéine de stress p38. Sous l'effet des UV, l'activation de la protéine de stress p38 dans les kératinocytes induit la transcription de la proopiomélanocortine, précurseur de l'αMSH et de l'ACTH. Alors que le facteur de transcription MITF intervient dans la pigmentation constitutive, le facteur de transcription USF-1, phosphorylé par la kinase p38 suite à une stimulation par les UV, est impliqué dans

la réponse pigmentaire (Galibert *et al.*, 2001; Corre *et al.*, 2004). USF-1 augmente l'expression des gènes de la pigmentation (*POMC*, *MC1R*, *TYR*) en réponse à la stimulation par les UV (Galibert *et al.*, 2001; Corre *et al.*, 2004).

c) Rôle de la protéine suppresseur de tumeur p53

Il a été montré que la protéine suppresseur de tumeur p53 tend à augmenter la mélanogenèse après une irradiation UV, en augmentant le taux d'ARNm de la tyrosinase par deux mécanismes :

- elle stimule l'expression dans les kératinocytes épidermiques, laquelle active à tour de rôle les mélanocytes voisins *via* le récepteur MC1R
- elle stimule directement l'expression des gènes codant *TYR* et *TYRP1* dans les mélanocytes. Des sites de fixation potentiels à la p53 ont en effet été identifiés dans le promoteur de *TYRP1* (Nylander *et al.*, 2000).

Dans les kératinocytes, une exposition aux UVB induit l'expression de *POMC* *via* la p53, laquelle conduit à la sécrétion d' α MSH et la régulation à la hausse de la mélanogenèse *via* MC1R (Slominski et Wortsman, 2000). Il a en effet été montré que le promoteur de *POMC* contient un site de fixation à p53, nécessaire pour une activité accrue (Cui *et al.*, 2007).

d) Régulation par le pH

Fuller *et al.* (2001) ont rapporté que les mélanosomes des mélanocytes dérivés d'humains à la peau claire ont des niveaux d'activité plus bas de TYR et sont plus acides que les mélanosomes des mélanocytes dérivés d'humains à la peau noire, qui ont une activité TYR plus élevée. Depuis, l'importance du pH mélanosomal pour la pigmentation de la peau a été acceptée, bien que les mécanismes et les acteurs en jeu n'aient pas été totalement élucidés.

a) Les ATPases vacuolaires

Un des principaux facteurs impliqués dans cette régulation du pH sont les ATPases vacuolaires (V-ATPase). Leur présence dans les mélanosomes a été démontrée par des analyses protéomiques (Basrur *et al.*, 2003). Cheli *et al.* (2009) ont montré que l'activation de la voie de l'AMPc par l' α MSH ou la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, augmente le pH des mélanosomes et régule l'expression de nombreuses V-ATPases et transporteurs d'ions. L'AMPc régule notamment à la hausse l'expression des sous unités de la V-ATPase, laquelle peut induire une acidification des mélanosomes. Les V-ATPases sont des molécules clés dans la régulation du pH des organelles et, plus particulièrement dans l'acidification des mélanosomes.

b) Famille des SLC : implication de NCKX5, MATP/SLC45A2, et de la protéine P

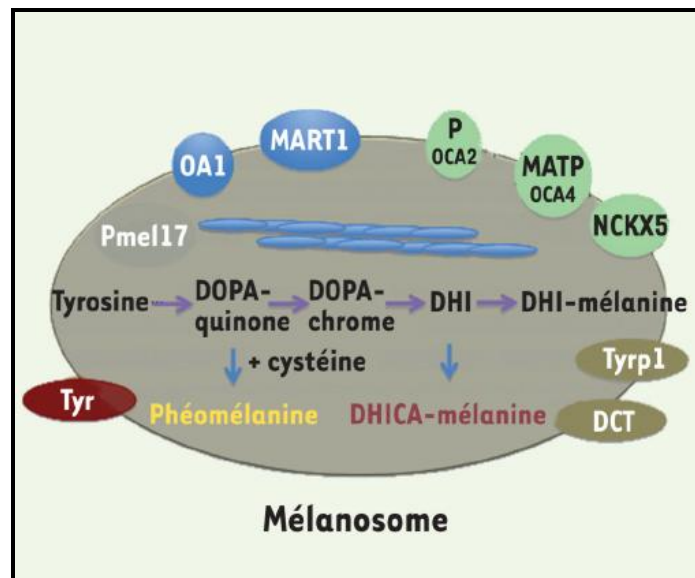
Les échanges d'ions à travers la vaste famille des SLC (*solute carriers*), groupe de protéines membranaires de transport, jouent également un rôle central dans la régulation du pH mélanosomal. En effet, un échangeur d'ions $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ potassium dépendant, la protéine NCKX5 (*N-sodium C-calcium K-potassium X-exchanger*) codée par *SLC24A5*, a été détectée dans les mélanosomes (Lamason *et al.*, 2005) et Ginger *et al.* (2008) ont démontré qu'il contrôle la mélanogenèse chez les mélanocytes de souris et d'homme.

De plus, SLC45A2, également appelée MATP ou AIM1 est aussi localisée dans les mélanosomes et est codée par le gène pathologique pour les albinismes oculocutanés (OCA) de type 4 (Newton *et al.*, 2001).

La protéine P, codée par le gène *OCA2*, est mutée dans les OCA de type 2. Cette protéine est un transporteur de sodium/sulfate de la famille des SLC13. La protéine P est aussi impliquée dans la régulation du pH mélanosomal. En effet, les mélanosomes des mélanocytes dérivés de souris *pink eyed* ont été rapportés comme ayant un pH moins acide qui ne favorise pas la synthèse de mélanine (Puri *et al.*, 2000, Brilliant 2001).

La figure 51 présente les acteurs des albinismes oculo-cutanés dans le mélanosome.

Figure 51 : Les protéines mélanosomales et les albinismes oculo-cutanés, d'après Delevoye *et al.* (2011)



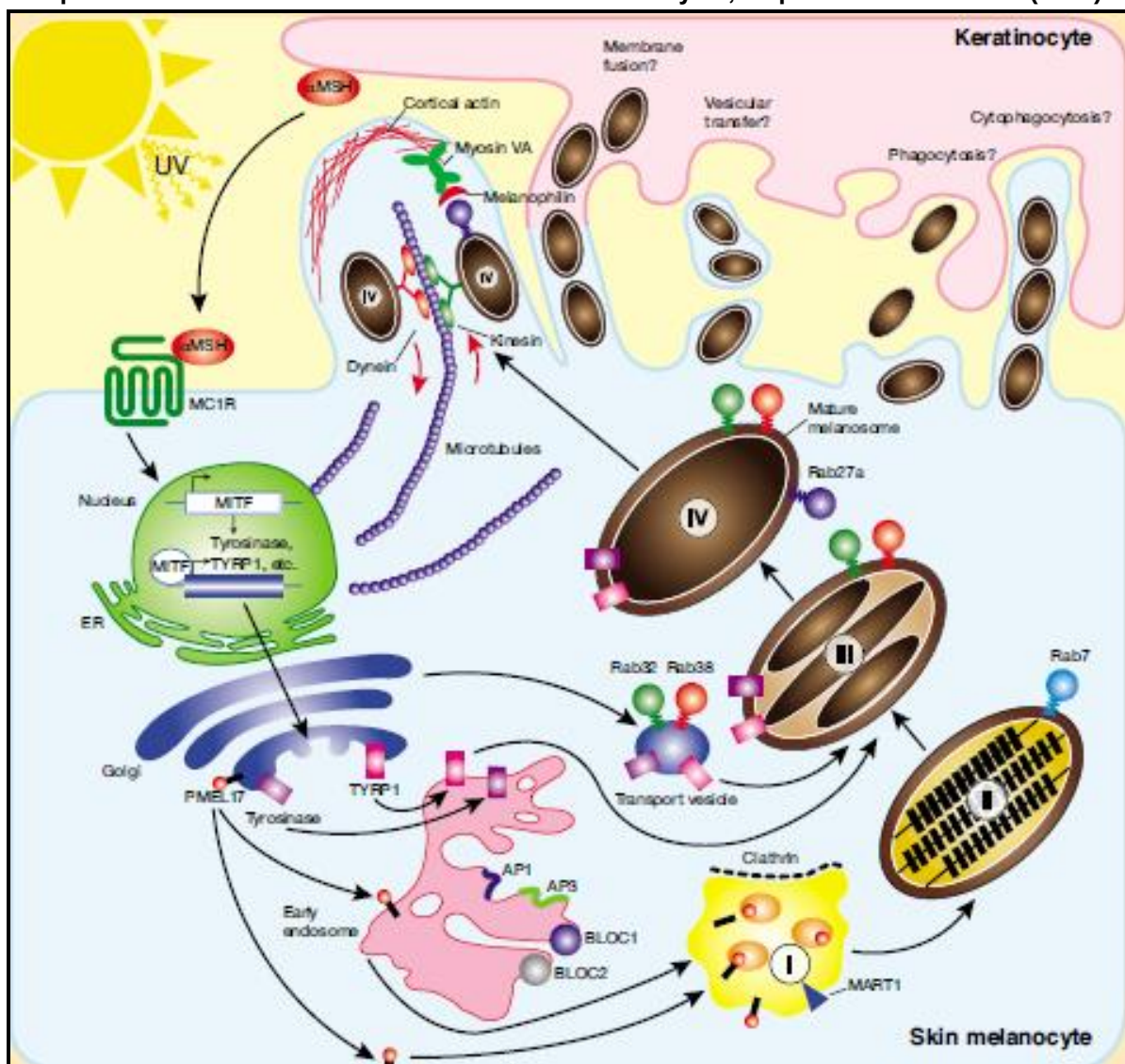
Représentation schématique d'un mélanosome et des protéines mélanosomales ainsi que de la chaîne de biosynthèse de la mélanine. PMEL17 est le constituant majoritaire des fibres (bleues) présentes dans la lumière du mélanosome. Les enzymes, tyrosinase (Tyr), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) et DCT (dopachrome tautomérase ou TYRP2) synthétisent la mélanine à partir de la tyrosine importée dans la lumière du mélanosome. OA1 (*ocular albinism type 1*) est un récepteur à 7 domaines transmembranaires impliqué dans la biogenèse des mélanosomes. MART1 a été identifié comme un antigène tumoral mais sa fonction est encore mal comprise. P, dont la mutation cause des albinismes oculocutanés (OCA2), MATP (OCA4), NCKX5 (ou SLC24A5) sont des transporteurs d'anions et de cations et pourraient réguler le pH de la lumière du mélanosome.

Ces observations ne sont pas en accord avec d'autres études qui ont démontré que la mélanogenèse est stimulée par des agents qui augmentent le pH mélanosomal (Fuller *et al.*, 2001; Ancans *et al.* 2000 et 2001; Saeki et Oikawa, 1985) ou que l'AMPc augmente la mélanogenèse et le pH mélanosomal. Le rôle exact de ces pompes, canaux, et échangeurs dans la régulation du pH des mélanosomes et dans la modulation de la pigmentation de la peau nécessite de plus amples investigations. Des études d'association sur tout le génome ont révélé de nouveaux gènes candidats qui réguleraient la mélanogenèse par le pH, tels que *SLC24A4*, *IRF4* (*interferon regulatory factor 4*) et *TPCN2* (*two-pore segment channel 2*) (Sturm 2009).

IV- Bilan des gènes impliqués dans la mélanocyto-genèse et la mélanogenèse chez la souris

L'acquisition d'un système pigmentaire fonctionnel nécessite que son développement embryonnaire se soit déroulé correctement et que tous les éléments impliqués dans le processus de pigmentation –mélanogenèse, transport et transfert des mélanosomes- se passent sans heurts. La figure 52 ci-dessous permet de replacer l'ensemble des principaux acteurs intervenant au cours de la mélanogenèse.

Figure 52 : Bilan sur les principales molécules intervenant au cours de la mélanogenèse, du transport et du transfert des mélanosomes aux kératinocytes, d'après Wasmeier *et al.* (2008)



Lors de la mélanocytogenèse, le rôle du facteur de transcription *MITF* est central. *MITF* permet de réguler l'expression des enzymes de la mélanogenèse TYR, TYRP1 et TYRP2 ainsi que de la protéine PMEL17, qui permettent la genèse des pigments mélaniques. Ces pigments sont élaborés et transportés dans des mélanosomes au sein des mélanocytes. Lors de leur maturation du stade I au stade IV, ils sont pris en charge par un réseau de molécules dont certaines ont pour rôle de leur adresser les enzymes nécessaires à leur développement et d'autres pour rôle de les transporter au sein de la cellule. Les complexes adaptateurs AP-1 et AP-3, les complexes BLOC et les protéines RAB sont les molécules clés pour l'adressage des protéines dans les vésicules et leur transport. Le complexe RAB27/MLPH/MyosinVa permet lui le déplacement des vésicules le long des filaments d'actine vers l'extérieur de la cellule alors que la mélanoréguline permettrait le transport rétrograde des mélanosomes. La taille des mélanosomes est régulée par un équilibre entre fusion et fission des vésicules.

Le mécanisme de transfert des mélanosomes des mélanocytes au kératinocytes reste encore l'objet de nombreuses interrogations, cependant, la phagocytose semble être une étape indispensable à ce transfert. Les molécules impliquées à cette étape sont des protéines RAB, des protéines SNAREs, des cadhérines, des lectines et des RHO GTPases.

La mélanogenèse est un processus qui peut être soumis à l'influence de facteurs internes ou externes à l'animal : pH mélanosomal, facteurs de croissance, stéroïdes, UV, monoxyde d'azote. Ces facteurs agissent *via* le récepteur à l' α MSH, MC1R, ou *via* la voie de la MAP kinase, conduisant dans tous les cas à la stimulation de l'expression de *MITF*.

Chez la souris, plus de 800 phénotypes associés à des allèles différents sont connus et 127 de ces allèles sont répertoriés à des loci de couleurs. Le tableau n° 8, de Bennett et Lamoreux (2003), recense les principaux gènes intervenant au cours de la mélanogenèse. Plusieurs lignées de souris présentant des troubles divers de la pigmentation associés ou non à des effets systémiques ont pu être sélectionnées et entretenues. Ce sont pour la plupart des lignées de souris servant de modèle pour des maladies de la pigmentation existant chez l'homme. Le tableau 9 recense les mutants de couleur non encore clonés lors de la parution de l'article.

Tableau 8 : Gènes de souris clonés intervenant au cours de la mélanocytogenèse, d'après Bennett et Lamoreux (2003)

Symbol (old symbol)	Name (old name)	Chromosome	Function	Human symbol	Human chr/some	Syndrome
(a) Melanocyte development						
<i>Adam17</i>	A disintegrin and metalloprotease domain 17	12	Protease, processing various bioactive proteins	<i>ADAM17</i>	2p25	N
<i>Adamts20</i> (<i>bt</i>)	A disintegrin and metalloprotease domain (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20 (belted)	15	Metalloprotease. Melanoblast migration?	<i>ADAMTS20</i>	12q12	N
<i>Brcal</i>	Breast cancer 1	11	Development of various organs; tumor suppressor	<i>BRCA1</i>	17q21	BC
<i>Eda</i> (<i>Ta</i>)	Ectodysplasin-A (tabby)	X	Sweat gland, tooth and hair morphogenesis	<i>ED1</i>	Xq12-q13	EDA/HED
<i>Edn3</i> (<i>ls</i>)	Endothelin 3 (lethal spotting)	2	Growth and differentiation factor	<i>EDN3</i>	20q13	HD, WSS
<i>Ednrb</i> (<i>s</i>)	Endothelin receptor type B (piebald spotting)	14	Growth factor receptor	<i>EDNRB</i>	13q22	HD, WSS
<i>Egfr</i> (<i>Dsk5</i>)	Epidermal growth factor receptor (dark skin 5)	11	Growth factor receptor	<i>EGFR</i>	7p12.3	N
<i>Fcgr2</i>	Fcγ receptor 2	7	Growth factor receptor	<i>FCGR2</i>	10q26	Cs, PIS
<i>Ikbkg</i>	Inhibitor of κB kinase, γ subunit (NEMO)	X	IκB kinase. Required for NFκB signaling	<i>IKBKG</i>	Xq28	IP, HED-ID, EDA-ID
<i>Kit</i> (<i>W</i>)	Kit oncogene (white spotting)	5	Growth factor receptor	<i>KIT</i>	4q11-q12	PS
<i>Kitl</i> (<i>Sl</i>)	Kit ligand (steel)	10	Growth and differentiation factor	<i>KITLG</i>	12q22	N
<i>Krt2-17</i> (<i>Dsk2</i>)	Keratin 2-17 (dark skin 2)	15	Cytoskeleton	<i>KRT2A</i>	12q11-q13	IBS
<i>Lmx1a</i> (<i>dr</i>)	LIM homeobox transcription factor 1α (dreher)	1	Transcription factor	<i>LMX1A</i>	1q22-23	N
<i>Mcoln3</i> (<i>Va</i>)	Mucopolip 3 (variant-waddler)	3	Cation channel	<i>MCOLN3</i>	1p22.3	N
<i>Mitf</i> (<i>ml</i>)	Microphthalmia-associated transcription factor (microphthalmia)	6	Transcription factor	<i>MITF</i>	3p12-14	WS2
<i>Pax3</i> (<i>Sp</i>)	Paired box gene 3 (spotch)	1	Transcription factor	<i>PAX3</i>	2q35	WS1, WS3
<i>Sfnal</i> (<i>f</i>)	Sideroflexin 1 (flexed tail)	13	Trioxalate carrier	<i>SFXN1</i>	5q35.3	N
<i>Sna2</i>	Snail homolog 1 (flexed tail)	16	Transcription factor	<i>SNAIL2</i>	8q11	WS2
<i>Sox10</i> (<i>Dom</i>)	SRY-box containing gene 10 (dominant megacolon)	15	Transcription factor	<i>SOX10</i>	22q13.1	WSS
<i>Sox18</i> (<i>rg</i> , <i>Decl</i>)	SRY-box containing gene 18 (ragged, dark coat color 1)	2	Transcription factor	<i>SOX18</i>	20q13.33	N
<i>Wnt1</i>	Wingless-related MMTV integration site 1	15	Growth factor/morphogen	<i>WNT1</i>	12q13	N
<i>Wnt3a</i>	Wingless-related MMTV integration site 3A	11	Growth factor/morphogen	<i>WNT3A</i>	1q42	N
(b) Components of melanosomes and their precursors						
<i>Dct</i> (<i>sh</i>)	Dopachrome tautomerase (sl)	14	Melanosomal enzyme	<i>DCT</i>	13q31-q32	N
<i>Gpmmb</i>	Glycoprotein (transmembrane) NMB	6	Apparent melanosomal component	<i>GPMB</i>	7p15	N
<i>Map</i> (<i>uw</i>)	Membrane-associated transporter protein (underwhite)	15	Apparent transporter	<i>MAP</i>	5p	OCA4
<i>Rab38</i> (<i>chi</i>)	RAB38, member RAS oncogene family (chocolate)	7	Targeting of Tyrosinase	<i>RAB38</i>	11q14	N
<i>Sl</i> (<i>si</i>)	Silver (silver)	10	Melanosome matrix	<i>SILV</i>	12q13-q14	N
<i>Tyr</i> (<i>c</i>)	Tyrosinase (color, albino)	7	Melanosomal enzyme	<i>TYR</i>	11q21	OCA1
<i>Tyrl</i> (<i>b</i>)	Tyrosinase-related protein 1 (brown)	4	Melanosomal protein	<i>TYRP1</i>	9p23	OCA3
(c) Melanosome construction/protein routing (HPS-related)						
<i>Ap3b1</i> (<i>pe</i>)	Adaptor-related protein complex AP-3, β 1 subunit (pearl)	13	Organelle protein routing	<i>AP3B1</i> [HPS2]	15q15	HPS
<i>Ap3d</i> (<i>mh</i>)	Adaptor-related protein complex AP-3, δ subunit (mocha)	10	Organelle protein routing	<i>AP3D1</i>	19p13.3	N
<i>Vps33a</i> (<i>bf</i>)	Vacuolar protein sorting 33a (buff)	5	Organelle protein routing	<i>VPS33A</i>	12q24.31	N
<i>eno</i> (<i>mo</i>)	Cappuccino	5	Organelle biogenesis	<i>CNO</i>	4p16-p15	N
<i>Hps1</i> (<i>ep</i>)	Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (pale ear)	19	Organelle biogenesis and size	<i>HPS1</i>	10q24	HPS
<i>Hps3</i> (<i>coa</i>)	Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (cocoa)	3	Organelle biogenesis	<i>HPS3</i>	3q24	HPS
<i>Hps4</i> (<i>le</i>)	Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog (light ear)	5	Organelle biogenesis and size	<i>HPS4</i>	22q11-q12	HPS
<i>Hps5</i> (<i>ru2</i>)	Hermansky-Pudlak syndrome 5 homolog (ruby-eye 2)	7	Organelle biogenesis	<i>HPS5</i>	11p14	HPS
<i>Hps6</i> (<i>ru</i>)	Hermansky-Pudlak syndrome 6 homolog (ruby-eye)	19	Organelle biogenesis	<i>HPS6</i>	10q24.31	HPS
<i>Lyst</i> (<i>bg</i>)	Lysosomal trafficking regulator (beige)	13	Organelle biogenesis and size	<i>LYST</i>	1q42	CHS

Tableau 8 suite : Gènes de souris clonés intervenant au cours de la mélanocytogenèse, d'après Bennett et Lamoreux (2003)

<i>Muted (mu)</i> <i>Oal</i>	Muted (muted) Mouse homolog of human ocular albinism 1 (Nettleship-Falls)	13 X	Organelle biogenesis Melanosome biogenesis and size	<i>MTU</i> <i>OAI</i>	6p25-p24 Xp22.3	N OA
<i>p</i>	Pink-eyed dilution	7	³ Glutathione transport in ER. Melanosomal protein processing and routing.	<i>P</i>	15q11-q12	OCA2
<i>Pldn (pa)</i> <i>Rabgta (gm)</i>	Pallidin (pellid) Rab geranylgeranyl transferase, α subunit (gunmetal)	2 14	Organelle biogenesis	<i>PLDN</i> <i>RABGGTA</i>	15q15.1 14q11.2	N Ch
(d) Melanosome transport <i>Mplh (ln)</i> <i>Myo5a (d)</i> <i>Myo7a (sh-1)</i> <i>Rab27a (ash)</i>	Melanophilin (leadin) Myosin Va (dilute) Myosin VIIa (shaker-1) RAB27A, member RAS oncogene family (ashen)	1 9 7 9	Melanosome transport Melanosome transport Melanosome transport (pigmented retina) Melanosome transport	<i>MLPH</i> <i>MYO5A</i> <i>MYO7A</i> <i>RAB27A</i>	2q37 15q21 11q13.5 15q15-q21	N GS US IB GS
(e) Eumelanin and pheomelanin <i>a</i> <i>Atm (ng)</i> <i>Ggt1</i> <i>Gl</i> <i>Mclr (e)</i> <i>Mgml (md)</i> <i>Pomcl</i>	Non-agouti Atractin (mahogany) γ Glutamyltransferase 1 Grey-lethal Melanocortin 1 receptor (extension) Mahogunin, ring finger 1 (mahoganoid) Pro-opiomelanocortin- α	2 2 10 10 8 16 12	Eumelanin/pheomelanin switch Eumelanin/pheomelanin switch (among others) Glutathione metabolism (pheomelanin synthesis) Pheomelanin and osteoclast function Eumelanin/pheomelanin switch (among others) Melanin color, CNS role, E3 ubiquitin ligase Eumelanin/pheomelanin (and endocrine)	<i>ASIP</i> <i>ATRN</i> <i>GGT loci</i> (several) <i>GL</i> <i>MCLR</i> <i>MGRN1</i> <i>POMC</i>	20q11.2 20p13 22q11 6q21 16q24.3 16p13.3 2p23.3	N N GU SRO RH N O and RH
(f) Systemic effects <i>Atp7a (Mo)</i> <i>Atp7b (tx)</i> <i>Bcl2</i> <i>Ercc2</i>	ATPase, Cu ²⁺ transporting, α polypeptide (mottled) ATPase, Cu ²⁺ transporting, β polypeptide (toxic milk) B-cell leukemia/lymphoma 2 Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	X 8 1 7	Copper transport Copper transport Inhibitor of apoptosis DNA excision repair	<i>ATP7A</i> <i>ATP7B</i> <i>BCL2</i> <i>ERCC2</i>	Xq13.2-q13.3 13q14-q21 18q21.3 19q13	MD WD BCL XPD, TTD, CS

See refs (2, 5) for more information on any locus.
N: none known, BC: breast cancer, BCL: B-cell lymphoma, Ch: chondrodysplasia, CHS: Chediak-Higashi syndrome, CS: Cockayne syndrome, EDA: ectodermal dysplasia, anhidrotic, EDA-4D: EDA with immune deficiency, GS: Griscelli syndrome, GU: Glutathione metabolism, HED-4D: HED with immune deficiency, HPS: Hermansky-Pudlak syndrome, HD: Hirschsprung disease, HSS: Hirschsprung-Shah syndrome, IP: ichthyosis bullosa of Siemens, IP: incontinentia pigmenti, MD: Menke's disease, O: obesity, OA: ocular albinism, OCA1-4: oculocutaneous albinism types 1-4, PIS: Pfeiffer syndrome, PS: piebald syndrome, RH: red hair (included although not a defect), SRO: severe recessive osteopetrosis, TTD: trichothiodystrophy, US IB: Usher syndrome, type 1B, WD: Wilson disease, WSI-3: Waardenburg syndrome types 1-3, WSS: Waardenburg-Shah syndrome (Waardenburg syndrome type 4), XPD: xeroderma pigmentosum, group D.

Tableau 9 : Loci de souris non clonés, à rôle supposé lors de la mélanocytogenèse, d'après Bennett et Lamoreux (2003)

Table 2. Summary of the uncloned mouse color genes (Categories and functions are generally provisional or speculative)

Symbol	Name	Chromosome	Possible function (or effect, in parentheses)
(a) Development?			
<i>Alm</i>	Anterior lenticonus with microphthalmia	?	Eye, coat, others
<i>baln2</i>	Balance 2	?	Eye, coat, neurological
<i>Bst</i>	Belly spot and tail	16	Eye, coat, skeletal
<i>Bswt</i>	Belly spot with white toes	1	(Belly spot, white hind toes)
<i>bt2</i>	Belted 2	?	(White belt)
<i>crsp</i>	Cryptorchidism with white spotting	5	Coat and skin pigment, male reproductive system.
<i>Dc</i>	Dancer	19	Head pigment, ear, palate, neural
<i>dds</i>	Dorsal dark stripe	15	Dorsal pigment
<i>dwg</i>	Dwarf grey	?	Multiple, including pheomelanin, osteoclasts
<i>fc</i>	Flecking	2	(Head and belly spot)
<i>Fk</i>	Fleck	?	(White on belly, tail, feet)
<i>gr</i>	Grizzled	10	Pheomelanin, tail
<i>gt</i>	Gray tremor	15	Pheomelanin, spotting, neurological
<i>hs</i>	Head spot	?	(Head spot)
<i>Ku</i>	Kumba	14	(Belly spot, curly tail)
<i>Ph</i>	Patch deletion region (patch)	5	(White spotting. Responsible gene in deletion unknown. Not <i>Pdgfra</i> .)
<i>pwk</i>	Patchwork	10	Autocrine growth of melanocytes?
<i>rg</i>	Rotating	?	Ear development, neural, sometimes belly spot
<i>rn</i>	Roan	14	(Micro-spotting, whole coat)
<i>rs</i>	Recessive spotting	5	Melanocyte numbers. Interacts with Kit
<i>smk</i>	Smoky	?	Pigment color, reproductive system
<i>tp</i>	Taupe	7	Pigment color, female reproductive system
<i>vl</i>	Vacuolated lens	1	Lens, spine development, sometimes belly spot
<i>vs</i>	Variable spotting	9	(White on belly, head, tail, feet)
<i>Whto</i>	White toes	7	Color, digit development
<i>wn</i>	White nose	15	(White nose, ventral streak)
<i>Xs</i>	Extra-toes spotting	7	Color, digit development
<i>ysb</i>	Yellow submarine	3	Ear, neural, eumelanin
(b) Melanocyte function only?			
<i>brwd</i>	Brownoid	?	Melanin color (brown)
<i>da</i>	Dark	7	Pheomelanin
<i>dp</i>	Dilution-Peru	15	(Pale coat)
<i>dsu</i>	Dilute suppressor	1	Melanosome transport?
<i>gdh</i>	Golden	?	Eumelanin
<i>rmy</i>	Rimy	11	Pheomelanin
<i>sea</i>	Sepia	1	(Coat color dilution)
<i>U</i>	Umbrous	?	Pheomelanin
<i>Up</i>	Umbrous-patterned	?	Pheomelanin (patchy)
(c) Melanocytes and platelets (HPS-related?)			
<i>m</i>	Misty	4	Adenine nucleotide metabolism
<i>rp</i>	Reduced pigmentation	7	Organelle biogenesis
<i>sdy</i>	Sandy	13	Organelle biogenesis
<i>sut</i>	Subtle grey	3	Organelle biogenesis
(d) Systemic effects			
<i>acd</i>	Adrenocortical dysplasia	8	Adrenal cortex development
(e) Dark skin			
<i>Dfp</i>	Dark foot pads	?	Skin color
<i>Dfp2</i>	Dark foot pads 2	4	Skin color
<i>Dsk1</i>	Dark skin 1	19	Skin color
<i>Dsk3</i>	Dark skin 2	7	Skin color
<i>Dsk4</i>	Dark skin 4	4	Skin color
<i>Dsk6</i>	Dark skin 6	3	Skin color
<i>Dsk7</i>	Dark skin 7	10	Skin color
<i>Dsk8</i>	Dark skin 8	3	Skin color
<i>Dsk9</i>	Dark skin 9	11	Skin color
<i>Dsk10</i>	Dark skin 10	19	Skin color
<i>soo</i>	Sooty foot	2	Skin color
(f) Unknown			
<i>fe</i>	Faded	6	(Progressive coat fading; skin lesions)
<i>fnld</i>	Faint lined	X	Hemizygous lethal. Fine dorsal striping.
<i>Fw</i>	Fawn	?	(Lightens <i>Rn</i> mutant mice)
<i>ge</i>	Greige	1	(Paler coat and skin in dilute, brown mice)
<i>gri</i>	Grey intense	11	?Pigment color
<i>lgr</i>	London grey	?	(Grey coat, later patchy, systemic effects)
<i>Li</i>	Lined	X	Hemizygous lethal. Fine striping. Deletion that includes <i>Rsk2</i>
<i>Meh</i>	Modifier of chinchilla	?	<i>Tyr^{c-ak}</i> mice look browner
<i>Mcm1</i>	Modifier of chinchilla-mottled 1	?	Lightens <i>Tyr^{c-m}</i> mice
<i>Mcm2</i>	Modifier of chinchilla-mottled 2	?	Lightens <i>Tyr^{c-m}</i> mice
<i>Och</i>	Ochre	4	Eumelanin, balance, other
<i>Sta</i>	Autosomal striping	X	(Striping in both sexes)
<i>Strg</i>	Striped greasy	X	Hair texture and color
<i>wuf</i>	White under fur (extinct?)	?	(Underfur white)
<i>Ym</i>	Yellow mottled	X	(Yellow mottling, hemizygous lethal)

TROISIEME PARTIE

Etude expérimentale des couleurs caramel et abricot chez le chat

I- Etude du mode de transmission des couleurs caramel et abricot

Si Patricia Turner a émis l'hypothèse dans les années 1970 que le mode de transmission des couleurs caramel et abricot était autosomique dominant (<http://www.caramelapricotfederation.co.uk/>), il nous a paru essentiel de vérifier la véracité de cette hypothèse. En effet, celle-ci a été émise à l'époque sur l'observation d'un nombre restreint de portées, d'individus mais également de générations. Depuis l'apparition des premiers chats caramel et abricot il y a presque 40 ans, de nombreuses générations ont vu le jour, ce qui nous a permis de mettre en évidence le mode de transmission sur plusieurs générations. Nous avons également cherché à vérifier l'hypothèse principale selon laquelle la chatte Scintasilva Sue (cf Partie I, II, A-) serait à l'origine d'une grande partie des chats caramel et abricot ainsi que l'implication des persans chinchillas dans les lignées de chats caramel et abricot.

A- Modes de transmission

Afin d'élucider les bases génétiques des couleurs caramel et abricot, plusieurs hypothèses ont été avancées. Pour certains, elles résultent de l'expression des polygènes et ne sont que le reflet de la variabilité individuelle des individus. Ce ne seraient pas des couleurs à part entière mais plutôt le spectre d'expression des couleurs diluées sous l'influence d'autres gènes. Pour d'autres, elles sont sous la dépendance d'un seul et unique gène, qui suit les lois de Mendel.

a) Généralités

Il existe plusieurs modes de transmission d'un allèle pour un caractère mendélien :

- lié au chromosome Y : seuls les mâles seraient caramel ou abricot, ce qui n'est pas le cas.
- Lié au chromosome X, récessif ou dominant. Si le caractère était récessif lié à l'X, une grande disproportion entre les deux sexes serait observée : beaucoup plus de mâles que de femelles seraient caramel ou abricot, ce qui n'est pas le cas. Si le caractère était dominant lié à l'X, mâles et femelles pourraient le présenter, les femelles légèrement plus fréquemment que les mâles. Cependant, un mâle caramel ou abricot transmettrait à toutes ces filles. Une femelle transmettrait à 50% de ses descendants. Il n'a pas été observé de disproportion de transmission du caractère

entre mâles et femelles caramel et abricot. Les modes de transmission liés à l'X ont donc été écartés.

- Autosomique dominant, à pénétrance complète ou incomplète. Dans l'hypothèse d'une pénétrance incomplète, un chat pourrait être de génotype caramel ou abricot sans en présenter les caractéristiques phénotypiques. Un caractère mendélien peut également présenter une expressivité variable. Dans ce cas là, deux chats de même génotype présenteraient des phénotypes légèrement différents l'un par rapport à l'autre. Par exemple, deux chats caramel sur base bleue n'auraient pas exactement la même couleur.

- Autosomique récessif.

Les modes de transmission autosomiques, candidats, ont donc été examinés en détail.

b) Mode autosomique dominant

Un caractère est transmis selon le mode autosomique dominant si le gène en cause est porté par un autosome et si la présence d'un seul allèle muté suffit pour que le caractère se manifeste.

Si les couleurs caramel et abricot se transmettaient selon un mode autosomique dominant, les caractéristiques seraient les suivantes :

- autant de mâles que de femelles atteints car le gène impliqué est sur un autosome,
- un chat caramel/abricot a un de ses deux parents caramel ou abricot,
- un chat caramel/abricot a 50% de chance de transmettre la couleur à chacun de ses petits, à supposer que les petits soient homozygotes d/d ,
- la transmission de la couleur s'effectue sans saut de génération si la pénétrance est complète et si les individus sont de génotype d/d ,
- un mariage de deux chats de couleur diluée ne peut pas donner un chat caramel/abricot.

Dans le cas d'une pénétrance incomplète, la transmission peut ressembler à une transmission autosomique récessive.

Dans le cas d'une expressivité variable, certains porteurs de l'allèle Dm peuvent n'avoir que des signes phénotypiques très discrets. Ils ne sont pas considérés comme caramel ou abricot et la transmission semble alors sauter une génération.

c) Mode autosomique récessif

Un caractère est transmis selon le mode autosomique récessif si le gène en cause est porté par un autosome et si la présence de deux allèles mutés du gène est nécessaire pour que le caractère se manifeste. Les chats caramel et abricot seraient homozygotes pour la mutation *dilute modifier*.

Si les couleurs caramel et abricot se transmettaient selon un mode autosomique récessif, les caractéristiques seraient les suivantes :

- autant de mâles que de femelles atteints car le gène impliqué est sur un autosome,
- un mariage de deux chats de couleur diluée peut donner un chat caramel/abricot.

Pour certains caractères récessifs, on peut avoir l'impression que la transmission se fait selon un mode dominant. On parle de pseudodominance. Elle est due à la fréquence importante des hétérozygotes dans la population, qui fait que le caractère est présent à toutes les générations.

d) Proportions d'individus caramel et abricot obtenus à l'issue de divers croisements

Le tableau 10 ci-dessous compare les proportions d'individus caramel et/ou abricot attendus selon que le mode de transmission soit autosomique dominant à pénétrance complète soit autosomique récessif. Pour ces croisements tous les chats ont été considérés comme porteurs de l'allèle de dilution à l'état homozygote d/d .

Tableau 10 : Proportions théoriques d'individus caramel et abricot attendus dans diverses configurations de croisements selon que le mode de transmission soit dominant à pénétrance complète ou récessif.

Croisement	Mode de transmission autosomique dominant (pénétrance complète)	Mode de transmission autosomique récessif
Croisement de deux chats modifiés homozygotes: $Dm \times Dm \times DmDm$	Tous les chatons sont caramel ou abricot, de génotype $DmDm$ Proportion attendue caramel ou abricot : 100%	Tous les chatons sont caramel ou abricot, de génotype $dmdm$ Proportion attendue caramel ou abricot : 100%
Croisement d'un chat modifié hétérozygote et d'un modifié homozygote: $Dmdm^+ \times DmDm$	Tous les chatons sont caramel ou abricot, la moitié sont homozygotes $DmDm$ et l'autre moitié hétérozygotes $Dmdm^+$ Proportion attendue caramel ou abricot : 100%	La moitié des chatons sont caramel homozygotes $dmdm$, l'autre moitié est de couleur non modifiée hétérozygote $dmDm^+$ Proportion attendue caramel ou abricot : 50%
Croisement d'un chat modifié homozygote et d'un non modifié: $DmDm \times dm^+dm^+$	Tous les chatons sont caramel ou abricot, hétérozygotes $Dmdm^+$ Proportion attendue caramel ou abricot : 100%	Tous les chatons sont de couleur non modifiée hétérozygotes $dmDm^+$ Proportion attendue caramel ou abricot : 0%
Croisement de deux hétérozygotes: $Dmdm^+ \times Dmdm^+$	Trois chatons sur 4 caramel ou abricot (homozygotes $DmDm$ ou hétérozygotes $Dmdm^+$) et 1 chaton sur 4 est de couleur non modifiée (dm^+dm^+) Proportion attendue caramel ou abricot : 75%	Un chaton sur 4 est caramel ou abricot homozygote $dmdm$, 3 chatons sur 4 sont de couleur non modifiée (hétérozygotes $dmDm^+$ ou Dm^+Dm^+) Proportion attendue caramel ou abricot : 25%
Croisement d'un hétérozygote et d'un non modifié: $Dmdm^+ \times dm^+dm^+$	Un chaton sur deux est caramel ou abricot (hétérozygote $Dmdm^+$), l'autre est de couleur	Tous les chatons sont de couleur non modifiée, homozygotes Dm^+Dm^+ et

	non modifiée (dm^+dm^+) Proportion attendue caramel ou abricot : 50%	hétérozygotes $dmDm^+$ Proportion attendue caramel ou abricot : 0%
Croisement de deux non modifiés: $dm+dm+ \times dm+dm+$	Tous les chatons sont de couleur non modifiée, homozygotes dm^+dm^+ Proportion attendue caramel ou abricot : 0%	Tous les chatons sont de couleur non modifiée, homozygotes Dm^+Dm^+ Proportion attendue caramel ou abricot : 0%

B- Matériel et méthodes

Dans le cadre de notre étude, il a été effectué un recrutement de chats caramel et abricot et de chats témoins de couleurs diluées (c'est-à-dire bleue, faon, lilas ou crème) et non diluées. Ce recrutement a eu lieu auprès d'éleveurs de chats de races Siamoises, Balinaises, Orientales, Tonkinoises, Burmese, Sacré de Birmanie et British shorthair ou longhair, à l'aide d'une présentation du projet et d'un certificat de prélèvement (**annexe 4**) diffusés auprès des fédérations félines, clubs de race, forums d'éleveurs félines et auprès des éleveurs à l'aide du LOOF (Livre Officiel des Origines Félines).

Au total il a été recueilli le pedigree, deux brochettes buccales, une photo et parfois des poils, de 95 chats provenant d'élevages félines français, allemands, anglais, polonais et néerlandais. Le tableau 11 permet de classer les échantillons obtenus. Sur 95 prélèvements reçus, 49 provenaient de chats déclarés caramel ou abricot, 7 d'individus non déclarés caramel ou abricot mais suspects de l'être et 39 proviennent de chats de couleur de robe diluée ou non diluée qui ont constitué notre cohorte de chats témoins.

Tableau 11 : Chats recrutés pour l'étude

Race	Robe déclarée : Caramel	Robe déclarée : Abricot	Robe déclarée : diluée (lilas, bleue, fawn ou crème) suspecte d'être caramel ou abricot	Robe déclarée: diluée (lilas, bleue, fawn ou crème)	Robe déclarée: non diluée	Total
Siamois	5	1	0	1	1	8
Balinois	7	0	2	4	0	13
Oriental	8	6	2	4	3	23
Tonkinois	3	0	0	1	2	6
Burmese	0	0	1	0	1	2
Sacré de birmanie	14	1	2	14	7	38
British*	4	0	0	1	0	5
Total	41	8	7	25	14	95
49 individus caramel ou abricot 7 individus suspects 39 individus témoins						

* shorthair ou longhair

Pour chaque chat caramel ou abricot inclus dans l'étude et lorsque les informations fournies le permettaient, un arbre généalogique a été réalisé à l'aide des copies des pedigrees fournis par les éleveurs et des informations du site Pawpeds (<http://pawpeds.com/>). Le logiciel ayant été utilisé est le logiciel Pedigree Draw 6.0 (www.pedigree-draw.com). Les données ainsi recueillies ont été comparées aux proportions attendues de chats caramel et abricot dans une portée dans le cas d'une transmission sur un mode autosomique dominant à pénétrance complète et autosomique récessive.

Dans l'ensemble de cette thèse, la symbolique utilisée est la suivante: les femelles sont représentées par un rond, les mâles par un carré. Les chats de couleur de base sont représentés par des formes vides barrées d'une croix, ceux de couleur diluée sont représentés par des formes vides, enfin les chats de couleurs caramel ou abricot par des formes noires pleines (figure 53).

Figure 53 : Symbolique utilisée pour la représentation des arbres généalogiques

	: mâle de couleur caramel ou abricot.
	: femelle de couleur caramel ou abricot.
	: mâle de couleur diluée (bleu, lilas, faon ou crème).
	: mâle de couleur de base (noir, chocolat ou cinnamon).
	: croisement entre deux chats.
	: chat pour lequel des prélèvements nous sont parvenus.
	1 : Chat présent dans plusieurs arbres généalogiques. Le numéro permet de le retrouver d'un arbre généalogique à l'autre.
	: Chat dont il a été fait mention dans la Partie I de ce document, concernant les origines des chats caramel et abricot.

Pour les 56 chats caramel et abricot dont nous avons reçu des prélèvements (Tableau 11), il a également été effectué une recherche des ancêtres sur Pawpeds pour rechercher si ce chat descendait de la chatte Scintasilva Sue ou si l'un de ses ancêtres avait été croisé avec un Persan chinchilla.

C- Résultats

a) De la difficulté d'utiliser les informations recueillies et la base de données Pawpeds

Au total, 56 prélèvements de chats caramel et abricot et leurs pedigrees nous sont parvenus. Plusieurs difficultés se sont présentées au moment de dessiner les arbres généalogiques de ces chats. Il a en effet fallu tenir compte des possibles erreurs d'enregistrement des couleurs de leurs ancêtres, ce qui aurait faussé l'interprétation des arbres et donc le mode de transmission. En effet, une grande partie des pedigrees qui nous ont été envoyés ont été émis dans des pays qui ne reconnaissent pas le caramel ou l'abricot ou alors ont été émis à une date antérieure à sa reconnaissance officielle. Afin de limiter les erreurs inhérentes à ces aléas, seuls ont été exploités :

- les pedigrees émis dans des pays où le caramel et l'abricot sont reconnus et où la couleur des ancêtres figure sans équivoque possible sur le pedigree,
- les pedigrees accompagnés de notes de l'éleveur précisant pour chaque chat s'il est caramel, abricot ou de couleur diluée. Par exemple, un chat indiqué comme bleu sur le pedigree est précisé comme caramel par l'éleveur.

La seconde difficulté s'est présentée lors de l'utilisation de la base de donnée Pawpeds (<http://pawpeds.com/>). Cette base de donnée internationale a été créée en 2000 et regroupe, entre autres informations, les pedigrees classés en fonction des races. Cliquer sur le nom d'un chat permet de visualiser son ascendance sur 10 générations ainsi que sa progéniture. Cependant, cette base de donnée étant volontaire, tous les individus ne sont pas référencés -il manque des ascendants (figure 54) et des descendants- et des erreurs s'y sont glissées.

Figure 54 : Pedigree de Scintasilva Sue, d'après Pawpeds

Pedigree Progéniture (9) Réversible Fondation Pas de photo Pas d'information de santé			
Scintasilva Sue, F, XSH ns 11 Var-0, GB/GB			
Imprimable Générations: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Consanguinité = 0,0 % Partenaire Test			
Père Marisarni Dandino, SIA b, GB/GB	Annelida Tom Thumb, SIA n, 1962-02-22, GB/GB	CH Misselfore Chocolate Whey, SIA b, 1961-01-24, GB/GB	Annelida Jade Orchid, SIA n, 1960-10-14, GB/GB
	Supra Cobweb, SIA b, GB/GB	CH Misselfore Chocolate Whey, SIA b, 1961-01-24, GB/GB	Tanchai, SIA b, GB/GB
Mère Marisarni Retara, PER ns 12, GB/GB	Pas d'information dans la base de données	Pas d'information dans la base de données	Pas d'information dans la base de données
	Pas d'information dans la base de données	Pas d'information dans la base de données	Pas d'information dans la base de données
	Pas d'information dans la base de données	Pas d'information dans la base de données	Pas d'information dans la base de données
EXACTITUDE DU PEDIGREE NON GARANTIE			

Prenons l'exemple d'un chat de race Tonkinois dont la recherche dans la base de donnée Tonkinois nous amène à découvrir dans ses antécédents le chat Tolemac Franvalle Folly, de parents a priori inconnus selon cette base de donnée (figure 55).

Figure 55 : Antécédents de Tolemac Franvalle Folly dans la base de données Tonkinois, d'après Pawpeds

Franvalle Frangipani, OSH cm 22, GB/-	Ch. Caspa Camaroun, OSH b, 1991-10-11	Pas d'information dans la base de données
	Ch.Int. Tolemac Franvalle Folly, OSH xms 24, 1995-06-09	Pas d'information dans la base de données
Winnetou's Skywalker, OSH a 24, GB/-	Ch. Winnetou's Lavendel Lancelot, OSH c, 1998-08-06	Pas d'information dans la base de données
		Pas d'information dans la base de données
	Delicatin Paeonia Festiva, OSH g 24	Pas d'information dans la base de données

Cliquer sur ce chat permet de vérifier sa descendance et nous informe qu'il a donné un seul et unique chaton (figure 56).

Figure 56 : Descendance de Tolemac Franvalle Folly dans la base de données Tonkinois, d'après Pawpeds

Pedigree Progéniture (1) Réversible Fondation Pas de photo Pas d'information de santé						
Descendant de Ch.Int. Tolemac Franvalle Folly, F, OSH xms 24, 1995-06-09						1 progéniture
Ch.	Caspa Camaroun	M	OSH b	1991-10-11		1 progéniture
	Franvalle Frangipani	F	OSH cm 22		GB/-	1 progéniture
EXACTITUDE DU PEDIGREE NON GARANTIE						

Cependant, chercher ce même chat dans la base de données Siamois nous apporte des données bien différentes. Les noms des ancêtres sont répertoriés (figure 57) et la progéniture n'est plus de un mais de 3 chatons. Enfin on constate que la date de naissance et la couleur dans laquelle l'individu est enregistré diffèrent : dans la base de données Tonkinois, Tolemac Franvalle Folly est caramel silver sur base inconnue, né le 9 juin 1995 ; dans la base de données Siamois, il est caramel silver sur base lilas, né le 9 juillet 1995. Après vérifications, il s'agit pourtant bien du même individu.

On peut également noter que dans la base de donnée Tonkinois, sa descendante Franvale Frangipani est enregistrée en caramel sur base lilas alors qu'elle est enregistrée en lilas dans la base de données Siamois.

Figure 57 : Pedigree et progéniture de Tolemac Franvale Folly dans la base de données Siamois, d'après Pawpeds

Pedigree <u>Progéniture (3)</u> Réversible Fondation Pas de photo Pas d'information de santé						
Tolemac Franvale Folly, F, OSH cms 24 Var-7, 1995-07-09, GB/GB						
Imprimable Générations: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Consanguinite = 0,0 % Partenaire Test						
Père Tolemac Silverthorn, OSH bs 11, 1994-09-11, GB/GB	Onapromise Kobayashi Maru, OSH cms 24, GB/GB			Hizanherz Llamados, SIA ns 21 [n 21], 1991-04-22, GB/GB		
	Tolemac Brown Beauty, OSH b, 1990-11-05, GB/GB			GP & CH Onapromise Ebony Minstral, OSH n Var-8, 1988-11-17, GB/GB		
Mère Adouzsh Tolemac Caramella, OSH cms 11 Var-6, 1993-11-03, GB/GB	GC Tolemac Buccaneer, OSH b 24, 1992-05-15, GB/GB			Burdach Barley, OSH bs 24 Var-8, 1989-06-12, GB/GB		
	Adinnsh Coquilla Melissa, OSH c Var-5, GB/GB			Adivesh Riannon Rosella, OSH b Var-8, 1986-12-06, GB/GB		
				Tolemac Tiger Moth, OSH bs 24, 1991-06-12, GB/GB		
				Tolemac Amethyst Jewel, OSH c, 1990-06-09, GB/GB		
				Whipplewind Ginger Tree, OSH o Var-4, GB/GB		
			Haishir Aimee, OSH b Var-6, GB/GB			

Pedigree <u>Progéniture (3)</u> Réversible Fondation Pas de photo Pas d'information de santé						
Descendant de Tolemac Franvale Folly, F, OSH cms 24 Var-7, 1995-07-09, GB/GB						3 progéniture
CH	Caspa Camaroun	M	OSH b	1991-10-11	GB/GB	17 progéniture
CH	Franvale Frangipani	F	OSH c 22 Var-8	1996-08-08	GB/GB	1 progéniture
	Franvale Freckles	F	OSH b 24	1996-08-08		Aucune progéniture
	Franvale Highland Fling	M	OSH cms 11 Var-8	1996-08-08	GB/GB	3 progéniture

EXACTITUDE DU PEDIGREE NON GARANTIE

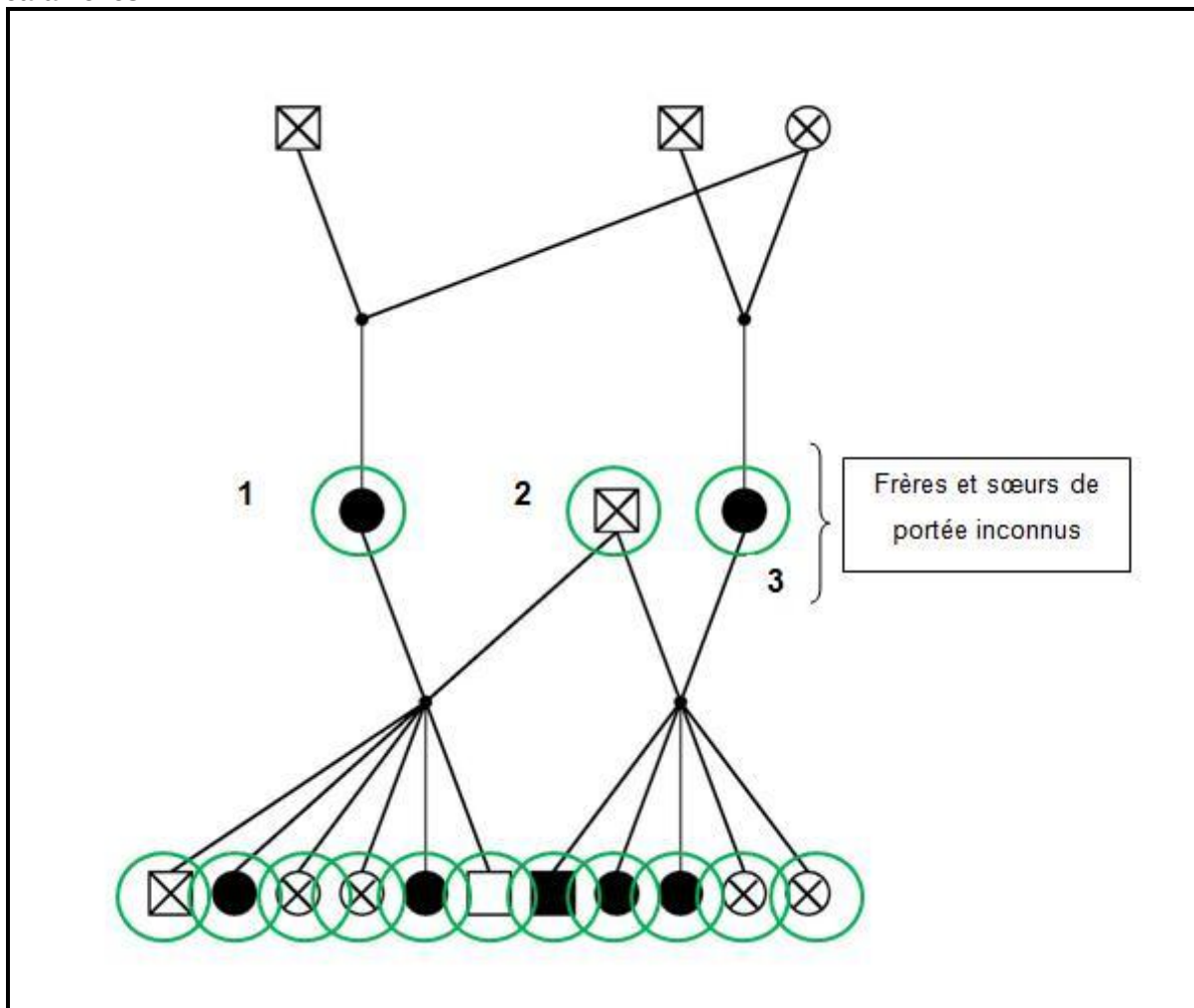
Cet exemple illustre la complexité d'utilisation de Pawpeds et les difficultés rencontrées lors des recherches. Ainsi, pour la suite de l'étude, nous avons utilisé les données de Pawpeds uniquement pour la recherche d'ancêtres communs et pas pour l'analyse statistique du mode de transmission.

b) Recherche du mode de transmission

a.1) Sacré de Birmanie, individus caramel sur deux générations

La figure 58 présente l'arbre généalogique d'une femelle Sacré de Birmanie ayant engendré deux filles de couleur caramel.

Figure 58 : Descendance d'une chatte Sacré de Birmanie ayant donné le jour à deux femelles caramelles.



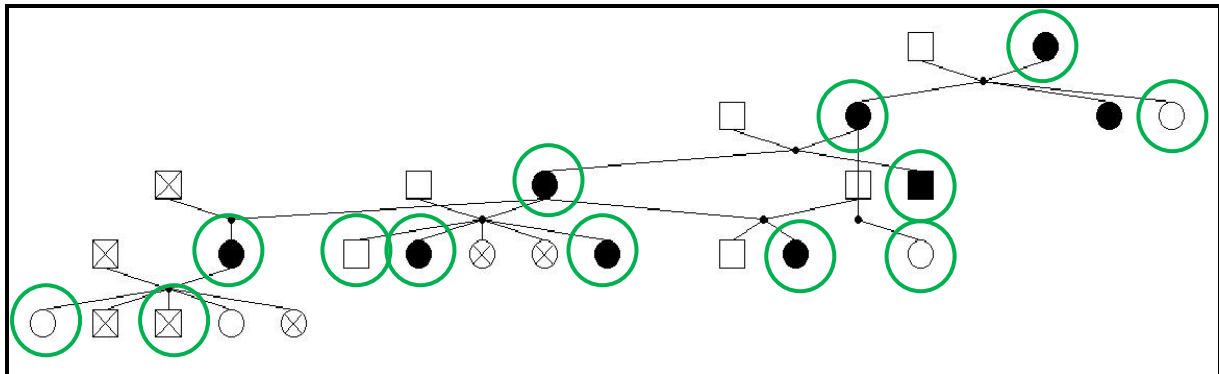
Légende : 1 et 3 : chattes caramel; 2 : mâle de couleur de base. Les données proviennent directement de l'éleveur des chats et non de Pawpeds.

Cet arbre généalogique est compatible avec les modes de transmission autosomiques dominant ou récessif. Dans le cas d'un mode de transmission dominant, les chattes 1 et 3 sont *DmDm* ou *Dmdm+*. Dans le cas d'un mode de transmission récessif, elles sont toutes deux *dmdm* et le mâle 2 est au minimum *dmDm+*.

a.2) Balinais : descendance sur 4 générations

La figure 59 présente l'arbre généalogique de chats Balinais.

Figure 59 : Arbre généalogique sur 5 générations de chats de race Balinais.



Les données proviennent directement de l'éleveur des chats et pas de Pawpeds.

Cet arbre généalogique est compatible avec les modes de transmission autosomiques dominant ou récessif, bien que le mode de transmission récessif soit peu probable. En effet, la proportion de chats caramel/abricot issu du mariage d'un caramel/abricot et d'un chat dilué est élevée et il est peu probable que les mâles dilués, non apparentés, utilisés avec les différentes chattes caramel/abricot aient été tous porteurs hétérozygotes de *Dm*, compte tenu de la rareté de cette variation. De plus, les données étant issues directement de l'élevage, nous pouvons effectuer une analyse statistique des données.

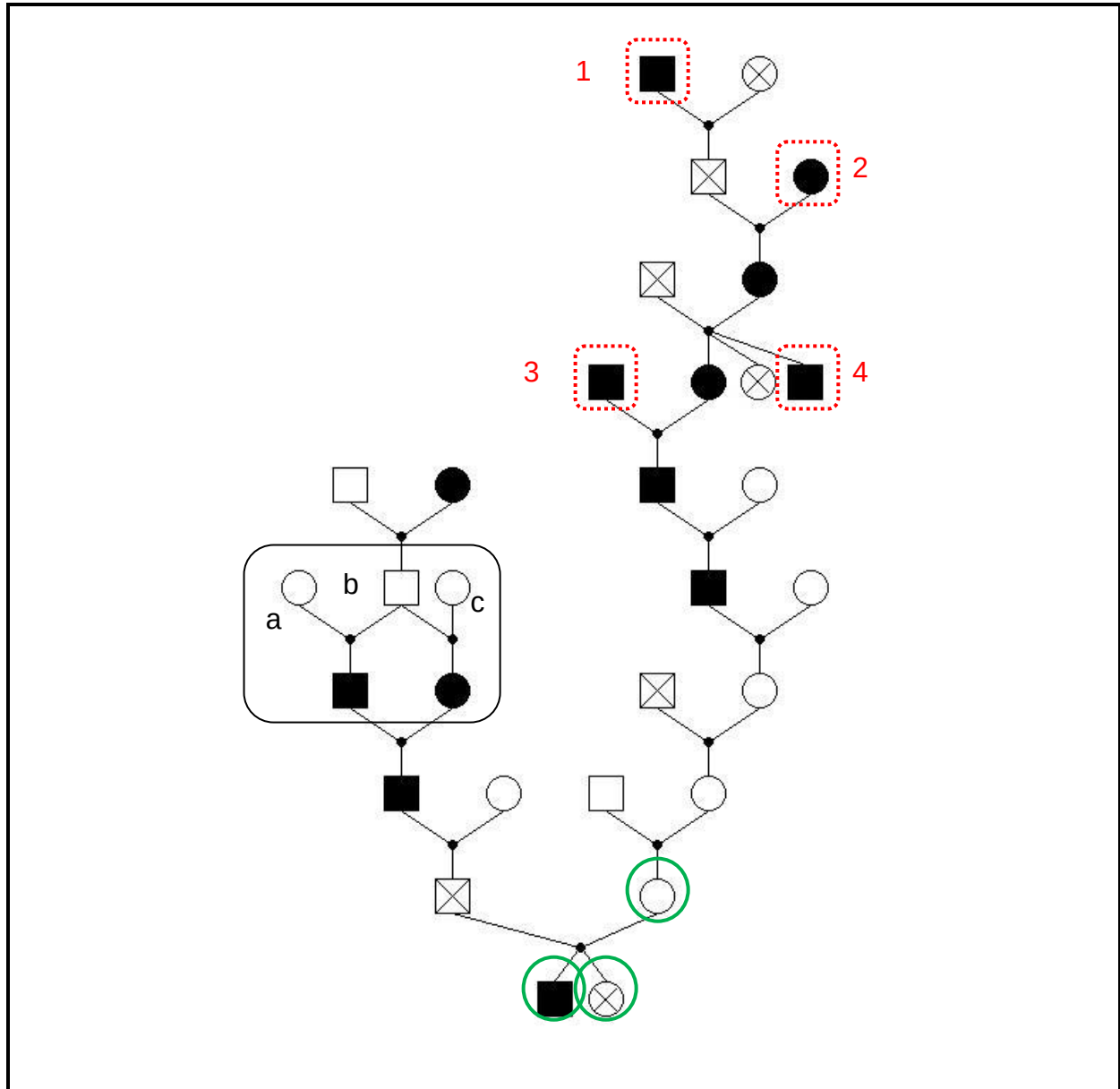
Les 5 portées issues de l'accouplement d'un chat dilué et d'un chat caramel/abricot comptaient un total de 13 chatons dont 7 caramel/abricot, 4 dilués et 2 de couleur non certifiée.

Pour comparer ces proportions nous avons donc écarté la portée avec les deux chats de couleur non certifiée pour obtenir 4 portées analysables avec un total de 8 chatons dont 5 caramel/abricot. Le test du χ^2 a permis d'écarter l'hypothèse autosomique récessif (différence statistiquement significative entre les distributions observée et théorique, $p=0,01$) et de valider l'hypothèse autosomique dominante (différence non statistiquement significative, $p=0,479$).

a.3) Tonkinois : descendance sur 9 générations

L'arbre suivant illustre les difficultés précédemment décrites auxquelles on est confronté lorsqu'on travaille avec la base de donnée Pawpeds. De nombreux croisements ne se soldent que par la naissance d'un unique chaton. Il est probable que les frères et soeurs n'aient pas été enregistrés.

Figure 60 : Arbre généalogique de chats de race Tonkinois sur 9 générations.



Données issues partiellement de Pawpeds.

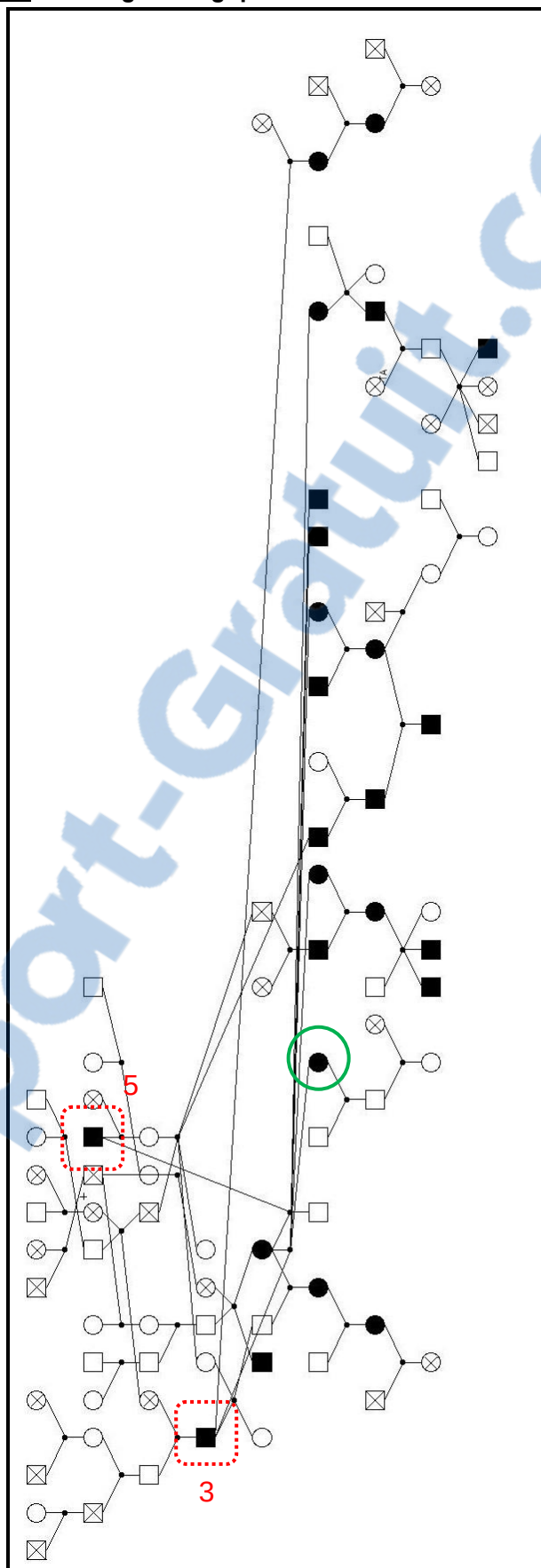
Les croisements entourés sur l'arbre ci-dessus (figure 60) concernant les individus a, b et c sont impossible dans l'hypothèse d'un mode de transmission dominant à pénétrance complète et sont en faveur d'un mode de transmission récessif ou dominant à pénétrance incomplète.

Cependant, le nombre élevé d'individus caramel ou abricot, même si nous n'avons probablement pas connaissance de tous les frères et sœurs de portées, fait penser à un mode de transmission dominant.

a.4) Quand Oriental Shorthair abricot et Siamois caramel se retrouvent

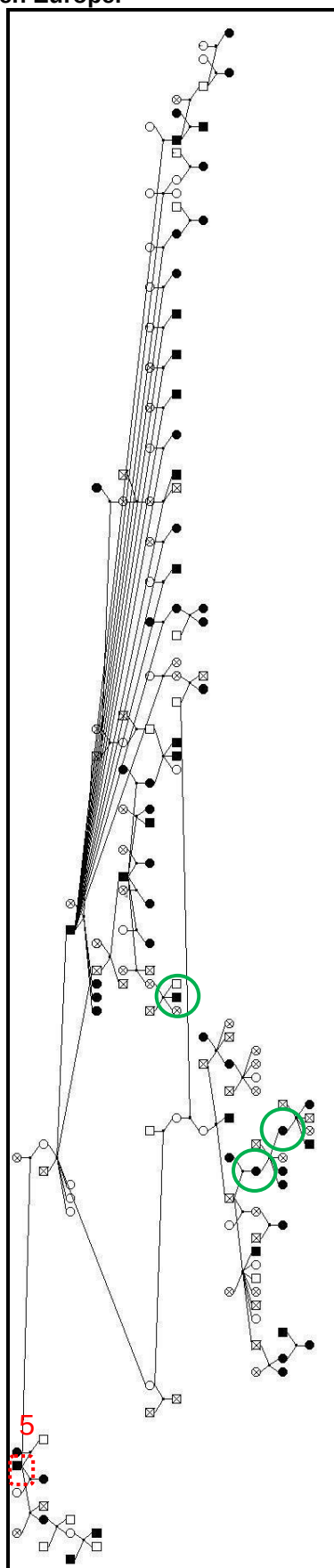
Les données obtenues grâce à la base de données Pawpeds et le pedigree d'un Oriental (figure 61) ont permis d'établir un lien de parenté entre ce chat et trois autres chats (figure 62) de race Siamois venant de deux autres chatteries en Europe. Ces quatre chats ont en effet l'individu 5 en commun (figure 61 et 62). On constate également que l'individu 3 est commun à l' Oriental Shorthair abricot et aux Tonkinois de l'arbre généalogique précédent.

Figure 61 : Arbre généalogique d'un Oriental shorthair abricot.



Données issues partiellement de Pawpeds.

Figure 62 : Mise en évidence d'une parenté sur l'arbre généalogique de trois Siamois provenant d'élevages différents en Europe.



Données issues partiellement de Pawpeds.

On constate, sur les figures 61 et 62, qu'un grand nombre de chats caramel/abricot sont issus systématiquement du mariage d'un chat caramel/abricot et d'un chat dilué ou non. Ceci est en faveur d'un mode de transmission dominant, bien que le mode de transmission récessif avec un grand nombre de porteurs hétérozygotes ne puisse être écarté. Cette dernière hypothèse est cependant peu probable compte tenu de la rareté de ces couleurs.

a.5) Bilan sur le mode de transmission

Au vu des résultats obtenus, le mode de transmission le plus probable des couleurs caramel et abricot dans l'échantillon de chats que nous avons analysé, est autosomique dominant.

c) Recherche d'un ancêtre commun aux chats caramel et abricot

Comme expliqué dans la première partie de ce document, l'hypothèse principale concernant les origines des couleurs caramel et abricot fait référence à la chatte Scintasilva Sue pour les races de morphotype oriental. Dans tous les cas, ce sont des croisements avec des Persans chinchilla qui sont supposés être à l'origine des couleurs caramel et abricot. Pour chaque chat caramel et abricot dont des prélèvements nous sont parvenus, il a été effectué des recherches grâce au site Pawpeds (www.pawpeds.com) afin de vérifier si ces chats avaient effectivement pour ancêtre cette chatte ou si ils étaient issus d'un croisement avec un Persan chinchilla à une génération donnée.

Parmi les 56 chats caramel/abricot pour lesquels des prélèvements ont été reçus, les données nécessaires à cette recherche ont pu être retrouvées pour 17 chats.

Parmi ces 17 chats figuraient quatre Sacré de Birmanie et 13 chats de races Siamois, Oriental et Tonkinois. Pour les quatre Sacré de Birmanie, nous avons retrouvé un ancêtre commun de race Persan, une femelle noire chinchilla née en juin 1970. Parmi les 13 chats de races Siamois, Oriental et Tonkinois, 11 avaient comme ancêtres communs Scintasilva Sue et sa fille Scintilla Serene Sunset, tandis que deux étaient issus de Scintilla Apollo, née en 1963. Scintilla Apollo et Scintasilva Sue ont en commun Camley Fudge, Siamois chocolat né en 1956, arrière arrière grand père de Scintasilva Sue et grand père de Scintilla Apollo. Fait intéressant, l'un des descendants de Scintilla Apollo, Rivendell Rudi, a été croisé avec la même chatte que le père de Scintasilva Sue, c'est-à-dire la chatte Persan chinchilla Marisarni Retara. On peut dès lors supposer que les descendants de ce chat n'aient pas été enregistrés ou que d'autres croisements avec Marisarni Retara ont été effectués avec la nombreuse descendance de Scintilla Apollo et que ceux-ci n'aient pas été répertoriés.

L'arbre généalogique ci-dessous (figure 63), dont les informations nécessaires à son élaboration ont été recherchées sur Pawpeds, présente une partie de la descendance de Scintasilva Sue. Seules les branches où il y a des individus caramel

ou abricot ont été développées. Sur ces branches, on peut retrouver certains individus dont les prélèvements nous ont été envoyés ainsi que des individus déjà rencontrés lors de la création des arbres généalogiques précédents. Un zoom de cet arbre généalogique est disponible en figure 64.

Figure 63 : Descendance partielle de Scintasilva Sue.

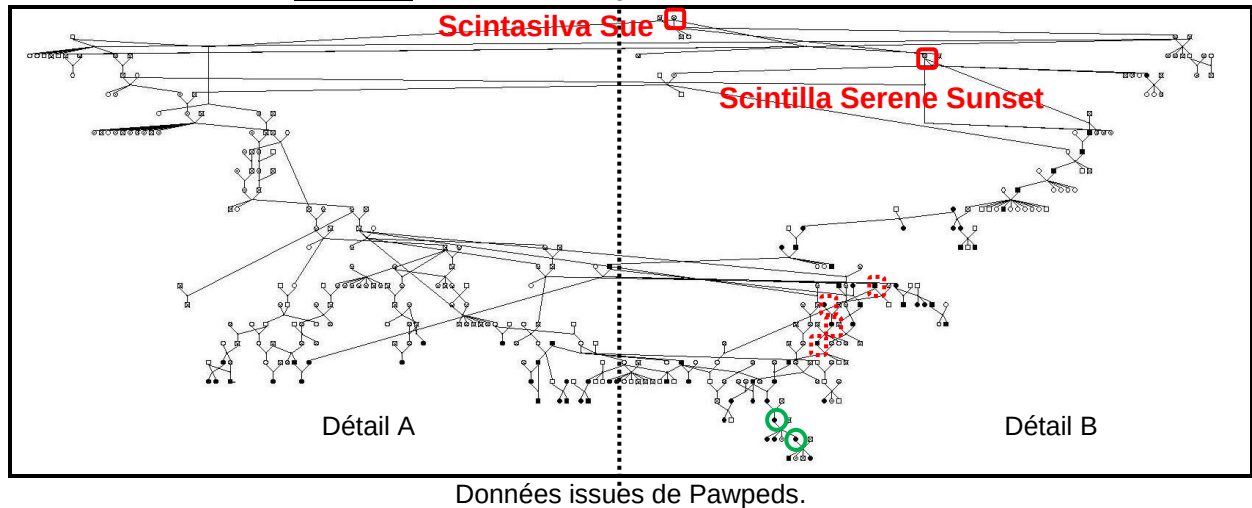
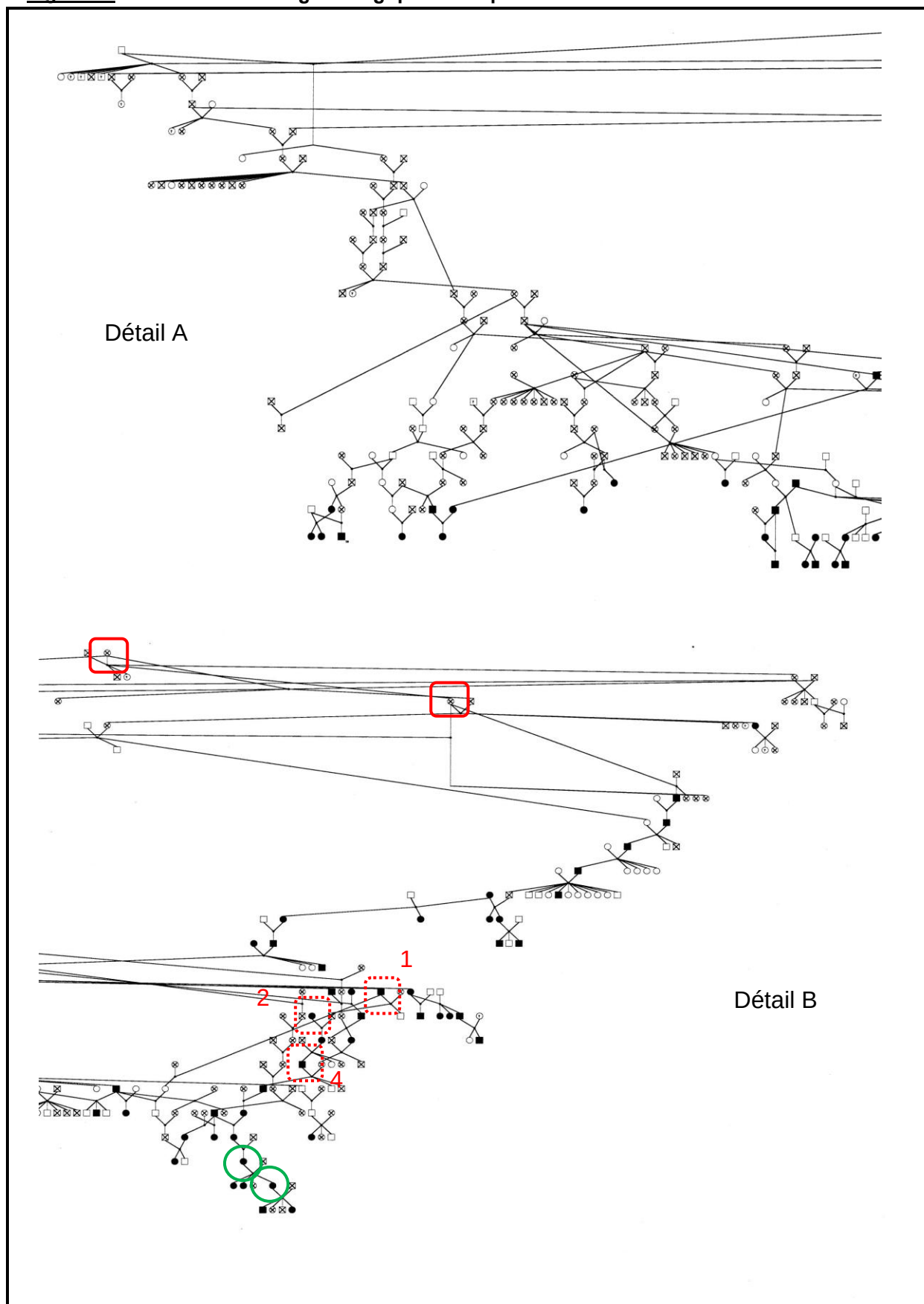


Figure 64 : Détails de l'arbre généalogique d'une partie de la descendance de Scintasilva Sue.



Données issues de Pawpeds.

Ces résultats sont donc effectivement en faveur de croisements avec un Persan chinchilla à l'origine des couleurs caramel et abricot et accréditent l'hypothèse selon laquelle la chatte Scintasilva Sue serait à l'origine d'une grande partie des chats caramel et abricot.

II- Recherche du support génétique des couleurs caramel et abricot

A- Démarche scientifique suivie

Pour identifier le gène responsable du phénotype *dilute modifier* chez le chat, il a été réalisé, dans un premier temps une recherche bibliographique qui a permis de mettre en évidence un gène candidat : le gène de la mélanoréguline. En effet une étude comparative des phénotypes de souris mutantes pour le gène de la mélanoréguline et porteuses de la mutation *dilute suppressor* et des chats portant la mutation *dilute modifier* révèle des similitudes. Dans ces deux espèces, les phénotypes mutants présentent non pas une robe de couleur diluée mais une robe d' une couleur plus chaude, plus sombre que celle attendue, voire une réversion totale de la couleur diluée chez la souris.

La séquence sauvage de *MREG* félin étant connue lorsque nous avons commencé cette étude, il a été réalisé dans un premier temps un séquençage afin de comparer l'enchaînement des nucléotides pour le gène de la mélanoréguline chez les chats caramel et abricot et les chats de couleurs diluées ainsi que le chat de référence séquencé, correspondant à un chat de race Abyssin (base de données Ensembl : www.ensembl.org). Suite au séquençage moléculaire, il a été réalisé un génotypage (par pyroséquençage) de 4 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) présents dans la séquence du gène de la mélanoréguline pour réaliser une étude d'association afin de vérifier si le locus *Dm* recouvrait le gène de la mélanoréguline.

B- Matériel et méthodes

a) Animaux

Les mêmes 95 chats utilisés pour l'étude généalogique ont été inclus dans l'étude génétique (tableau 11).

Pour le séquençage du gène de la mélanoréguline, seuls les ADN de 15 chats ont été utilisés, dont 8 caramel, 2 abricot , 4 contrôles dilués et 1 contrôle non dilué. En effet, le séquençage n'a pas pu être effectué sur tous les individus pour une raison de coût, aussi parmi les individus choisis figuraient (tableau 12):

- des chats de phénotype caramel ou abricot avéré. Ces chats provenaient de pays où la couleur est officiellement reconnue.
- des chats de phénotype caramel ou abricot très probable mais qui provenaient de pays où la couleur n'est pas officiellement reconnue
- des chats de couleur diluée avérée et dont le pedigree ne fait pas mention de parents caramel ou abricot.
- des chats de couleur diluée avérée et dont le pedigree fait mention de parents caramel ou abricot.
- un chat témoin non dilué, de couleur seal. Lors du séquençage, la séquence du gène de la mélanoréguline enregistrée dans la base de données Ensembl

correspond à la séquence d'un chat de race Abyssin et de couleur cinnamon. On peut donc considérer la séquence Ensembl comme un deuxième témoin de couleur non diluée.

- des chats de race typés orientaux et des chats Sacré de Birmanie afin de mettre en évidence un éventuel effet de race.

Tableau 12 : Chats utilisés pour le séquençage du gène de la mélanoréguline.

Chat N° X	Race	Couleur
<i>Chat N°1</i>	Oriental	Caramel sur base bleue
<i>Chat N°2</i>	Oriental	Caramel sur base lilas
<i>Chat N°3</i>	Oriental	Caramel (base non précisée par l'éleveur)
<i>Chat N°4</i>	Oriental	Abricot
<i>Chat N°5</i>	Sacré de Birmanie	Caramel sur base lilas
<i>Chat N°6</i>	Sacré de Birmanie	Caramel sur base bleue
<i>Chat N°7</i>	Siamois	Abricot
<i>Chat N°8</i>	Sacré de Birmanie	Caramel sur base bleue
<i>Chat N°9</i>	Sacré de Birmanie	Caramel sur base lilas
<i>Chat N°10</i>	Siamois	Caramel (sur base lilas) et abricot tortie
<i>Chat N°11</i>	Sacré de Birmanie	Lilas
<i>Chat N°12</i>	Sacré de Birmanie	Bleue
<i>Chat N°13</i>	Sacré de Birmanie	Bleue
<i>Chat N°14</i>	Sacré de Birmanie	Seal
<i>Chat N°15</i>	Sacré de Birmanie	Bleue

b) Prélèvements

Les prélèvements effectués étaient des prélèvements de cellules de la muqueuse buccale à l'aide d'une brosse buccale. La plupart ont été effectués par les éleveurs eux même ou leur vétérinaire puis envoyés au laboratoire par voie postale. En **annexe 4** figure le document envoyé aux éleveurs et la fiche de prélèvement. Certains chats ont été prélevés par mes soins lors de mon déplacement à l'exposition organisée par la *Caramel and Apricot federation* en Grande Bretagne en mai 2011.

c) Bases de données et logiciels

Les séquences nucléotidique et protéique ont été extraites de la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

La recherche d'analogies de séquences entre l'homme, le chimpanzé, la souris et le chat, a été effectuée grâce à l'utilitaire BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les alignements de séquences ont été effectués à l'aide du logiciel Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

La visualisation des chromatogrammes de séquençage a été réalisée à l'aide du logiciel Chromaslite 2.01 (Technelysium Pty Ltd : www.technelysium.com.au).

L'analyse des résultats de génotypage SNP a été réalisée à l'aide du logiciel PSQ96SNP (Qiagen S.A. France, Courtaboeuf France).

Le dessin des amorces de PCR et de séquençage a été réalisé grâce au logiciel Primer3® (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) pour les amorces de séquençage et grâce au logiciel PSQ Assay Design (Biotage®) pour les amorces de génotypage par pyroséquençage.

L'analyse de l'impact des changements d'acide-aminé a été réalisée à l'aide du logiciel Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Les tests du χ^2 ont été effectués dans Excel.

d) Extraction du matériel génétique

L'ADN des cellules de muqueuse buccale a été extrait grâce au kit Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification selon le protocole figurant à l'**annexe 5**. La concentration en ADN extrait de chaque échantillon a été mesurée *via* la mesure de l'absorbance grâce à un spectrophotomètre. Les ADNs obtenus ont ensuite été conservés à une concentration de 20 ng/μl et à une température de -20°C.

e) Amplification par PCR

Les amorces ont été commandées auprès de MWG Operon® (<http://www.eurofinsgenomics.eu/>).

- Amorces utilisées pour le séquençage des exons du gène *MREG*

Pour la PCR deux types d'amorces sont requises pour chaque exon à séquencer (tableau 13) :

- une amorce *forward* positionnée en 5' de la portion de génome à amplifier et séquencer ;
- une amorce *reverse* positionnée en 3' de la portion de génome à amplifier et séquencer.

Tableau 13 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des exons du gène *MREG* félin

Amorce	Séquence	Longueur (bases)	Température d'hybridation (°C)	Taux de GC (%)
Exon1				
MREGex1F	ggagacaataattcatatccttgta	25	58,1°	36%
MREGex1R	caaacatctcccctttccttc	21	57,9°	47,6%
Exon 2				
MREGex2F	gccacacatgtctctagcgta	21	59,8°	52,4%
MREGex2R	cacagtagctttaaccagccagt	23	60,6°	47,8%
Exon 3				
MREGex3F	tgggtgccttcttaatctct	21	57,9°	47,6%
MREGex3R	tgacagttgaaccctgctta	21	57,9°	47,6%
Exon 4				
MREGex4F	tgggtgtatggtcgtgtttaga	22	58,4°	45,5%
MREGex4R	tgtatgcatttgcctcacttg	21	55,9°	42,9%
Exon 5				
MREGex56F	tggaatagcatctgtacactgga	23	58,9°	43,5%
MREGex56R	gctggacttctcagctctgtgg	21	61,8°	57,1%

Légende : F : *forward*; R : *reverse*; ex : *exon*

- Amorces utilisées pour le génotypage par pyroséquençage

Pour le génotypage par pyroséquençage, trois amorces ont été utilisées (tableau 14) :

- une amorce *forward* positionnée en 5' de la portion de génome à amplifier et séquencer
- une amorce *reverse* positionnée en 3' de la portion de génome à amplifier et séquencer
- une amorce de séquençage interne au segment

Tableau 14 : Amorces utilisées pour le génotypage par pyroséquençage

SNP	Amorce « Forward »	Amorce « Reverse »	Amorce interne
SNP1	ctgccagtttcaaagtgatttta	biot*cgtcgctccaaatgaagaatat	acatacatgggatgca
SNP2	biot*ttttaaacaccacagcgatagc	gctccacaaattctttcatcatc	catctctcaccagcgt
SNP3	cgaagggaagtgaggaataggt	biot*ttgaggatacaaggcggatag	ttttataaaagtcatttg
SNP4	tgtaagattggctgaggaaacc	biot*agttgaaccctgcttaagattct	ttgtgtggaagtggga

Légende : biot* : biotine

Remarque : la réaction de pyroséquençage nécessite des monobrins d'ADNs. Afin d'obtenir des ADNs monobrins et non doubles brins, les amorces ont été biotinylées et les produits obtenus passés sur des microbilles de streptavidine.

- Réaction de PCR

L'amplification des fragments d'ADN obtenus suite à leur extraction des brossettes a été réalisée par PCR.

Les réactifs utilisés pour les réactions de PCR sont indiqués dans le tableau 15.

Tableau 15 : Réactifs utilisés pour les PCR

Réactifs	Quantité requise par tube (µL)	
	PCR pour le séquençage moléculaire	PCR pour le génotypage par pyroséquençage
Eau stérile	18,8 µl	36,5 µl
dNTP	0,5 µl	1 µl
Amorces (forward+reverse)	0,5 µl + 0,5 µl	1 µl + 1 µl
Tampon Taq (X10)	2,5 µl	5 µl
Taq polymérase	0,2 µl	0,5 µl
ADN à 20 ng/µl	2 µl	5 µl
Total	25 µl	50 µl

dNTP : désoxyribonucléotides libres.

Les programmes de PCR utilisés sont indiqués dans le tableau 16.

Tableau 16 : Programmes de PCR utilisés

Phase du cycle de PCR	Programme de PCR pour le séquençage moléculaire		Programme de PCR pour le pyroséquençage	
Dénaturation	4 minutes à 94°C		4 minutes à 94°C	
Cycles hybridation-élongation	Phase 1 : 30 secondes à 94°C	X 30 cycles	Phase 1 : 15 secondes à 94°C	X 50 cycles
	Phase 2 : 40 secondes à Tm		Phase 2 : 30 secondes à Tm	
	Phase 3 : 40 secondes à 72°C		Phase 3 : 30 secondes à 72°C	
Elongation terminale	5 minutes à 72°C		5 minutes à 72°C	

- Electrophorèse sur gel d'agarose

La qualité des amplifications par PCR a été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2,5% coloré au gel red avant envoi pour le séquençage ou le pyroséquençage. Pour préparer le gel d'agarose à 2,5 %, il a été utilisé 120 ml de tampon TAE (Tris Acétate EDTA), 3g d' agarose et 10 µl de gel red.

Dans chaque puits, il a été déposé 10 µl de l'échantillon à tester ou un marqueur de poids moléculaire (ladder 100 bp). La migration s'effectue sous 150 volts dans le tampon TAE. Après migration dans le gel, la lecture se fait sous un rayonnement UV qui permet de mettre en évidence les fragments amplifiés sous forme de bandes

fluorescentes ayant plus ou moins migré selon leurs poids moléculaires. Le gel est ensuite photographié à l'aide d'un appareil numérique.

f) Séquençage

Le séquençage a été réalisé par GATC® après envoi de 20 µl de produit PCR en concentration de 10 à 50 ng/µl et des amorces diluées à 10µM.

g) Génotypage par pyroséquençage

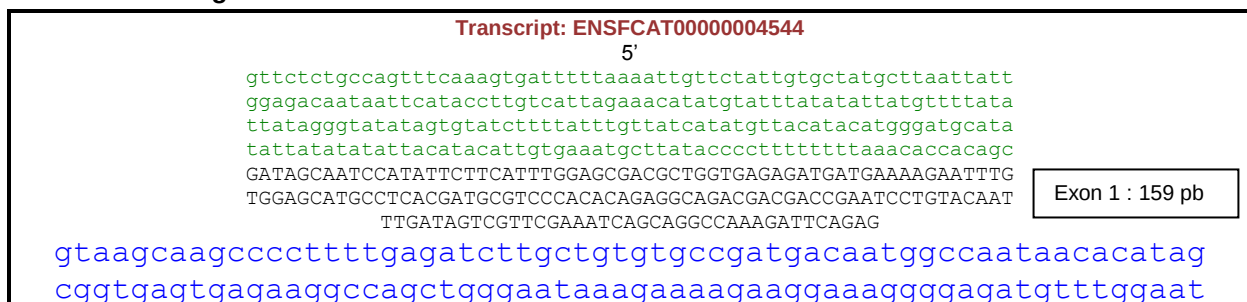
Un pyroséquençeur permet de séquencer une petite séquence de quelques dizaines de nucléotides au maximum (si on possède une amorce pour cette séquence) à l'aide d'une réaction lumineuse. La réaction de séquençage nécessite l'utilisation de monobrans d'ADN. Un appareil de recueil des ces monobrans d'ADN a été utilisé dans un premier temps (Biotage®, Uppsala, Suède : www.biotage.com). Il a été ajouté à 40 µl de produits de PCR 40 µl de microbilles recouvertes de streptavidine. Les billes ont été récupérées par aspiration sur les tiges d'un peigne, lequel a ensuite subi trois bains successifs de 5 secondes chacun, le premier bain étant de l'éthanol à 70%, le second une solution de dénaturation (Biotage®) et le troisième une solution de lavage (Biotage®). Les billes ont été déposées dans une plaque 96 puits de pyroséquençage (Biotage®) qui contenait l'amorce de séquençage à 1,6 µM en solution dans 40µl de tampon de séquençage (Biotage®). La plaque a ensuite été placée à 90°C pendant 2 minutes afin d'achever la dénaturation. Enfin, elle a été placée dans le pyroséquençeur PSQ96 (Biotage®) avec une cartouche contenant une enzyme polymérase (Biotage®), le milieu réactionnel (Biotage®) et les quatre bases A, T, G, C (Biotage®). Les résultats ont été transmis directement du pyroséquençeur à un ordinateur.

C- Résultats

a) Détermination de la séquence du gène de la mélanoréguline chez le chat

La séquence disponible pour le gène de la mélanoréguline dans la base de données Ensembl était la suivante (figure 65):

Figure 65 : Séquence nucléotidique disponible dans la base de données Ensembl pour le gène de la mélanoréguline chez le chat.



gagggcaggtattttagcagcctgtggttgctaattatagctggtcctggttagaccggct
cgataaacagataagactgacttccagttattacctaattgtgcaagggttacagaaac

.....

gtggggctccatgctgtcagcctgcttgggattctctctctctgcccctccccttattgc
tttctctgtctctctctctctcaaaataagtaaacacttaaaaaattaaagaaaaata
agaaagggtttgatgcttagtgaagaggagagccacacatgtctctagcgtatgtttggg
aattagatagcagtgtaggccaaggataaaaaataaaactgaatttttat

GAGTGGCAAAACTCAACTATGATATCTACACCTGCGACAGATTTCGAAGGGAAGTGAGG
AATAGGTGGAAACGCATTTTGAAGATTTAG

Exon 2 : 91 pb

gtgagtcggaagtgattatgacatgatacaaaataactagcgggtgatcattcctcttccc
tttcttctgcatgggtttttataaaaagtcataattgataactggctgggttaaagctactgtg
tactaattattttcccaatcctatccgccttgtatcctcaagcataaacatctgatgttt
ctgttacaccaaccgatgtcctgaggacatagtttgccatgcgttatgccatctgtcctc

.....

gaccgcgagatcgtgacctgggtgaagtcgggcttaacgggcttaaccaggcgcccat
caaatgagctttaattaaagaccccgcgtgatcatactgacctggaaagtagcacatggag
aggtgccttggcttccgctgtgtgttgggaaccacacatttgggtgccttcttaatctcct
gcaggaccaccgtgtcctgtgactgcttttacacgaggatacatttttttccccacag

GCTTTCAAAAGGAAGCAGACTCTTTGTGTGTCAGTGACGAAACTCAGCACCATCAGTGATT
CCAAAAACACAAGGAAAGCTCGGGAGATATTGTTAAGATTGGCTGAGGAAACCAATATT
TTCCAGCAAGTTGGGAGCTCTCGGAGAGATATCTCTTTGTGTG

Exon 3 : 164 pb

gtaagtggatatatatatatatatataaagtttatatattttgagagagagaatgtg
agcaggaaggggcagagagagaggcagagagaaagaatcttaagcaggggttcaactgt
cagcacggagcctgacttggggctccatcctaggaactgaaccttgagatcatgacctga
gcaaaatgaagagtcagacactcaatcaagtgaagccaccagtggtatgtgattaaaaaa

.....

aacgttgtttacataacctaagattaacaaagggtttgaaagggcactaagaatgtttct
tgaataatgtaagcaaagggtgaagggatatctctaaatttggtgagaaaaatttaagat
gtgttttgcttgcccatgattatttccaggctgggtgtatggctcgtgttttagattgtttt
cccattgacgtgggtttgttcccatcttgacaacatttgtattttttaaatctttggcag

GACCGTCTTATGCTCTTGATGTCAGCAGAAGAGTTCTTTAAATTTGCCAGTCGAACCTAT
CCCAAGAAACCTGGGGTCCCAACCTGGCAGATGGCCAGAAAGAA

Exon 4 : 105 pb

ctgcactaccttccatttccaagtccttaaggagaggctgggaggcagagctgggattc
cccacggggactcaacagccagcccaagtgggacaaatgcatacaggagaccgtaagcac
gtggagggccagttaagtgaataatgattctaaatcctataaaaaactaggggtttggac
atctggtcttcatgaggatgcctctgtaggaaaaattcaggttgactgaaacaggctgg

.....

gaaggagagttccaaatagatcgatcccaggcagagcttcttcagctctgtcttcagttg
tgggacacacgtcttaaatctaaatattagcaatacctgggtacctcatttttacatac
tatccatttctagacccaagcccttgatatttcatctggaatagcatctgtacactgga
atgtttgacctccacttcttctcttcttcttaaatctgtttctggcgtcttggctgagag

TTGTACCTGCCCAGTGACCTT

tag

Exon 5 : 21 pb

CACAGACTTGTGTCTCTGCGTCTGCAGGCAATATTGCACGGA
agaaggtcattgtgtacttttcttccattcagaagaggatttccaagatggagcagtgct
gaattacagcttgcttctagccacagactgagaagtcagcctcaaaagttacttgccac
ttaagcaaggaggttgccaggaaatcatggttcatgttactgaaaagactttcagaacct
gtaggattaccatagattgctgagaacaatggcgatattttacttttacagcctttg
3'

Exon 6 : 42 pb

En majuscules et en noir apparaissent les exons, en minuscule et en bleu les introns et en vert les séquences encadrant le gène.

Figure 67 : Séquence nucléotidique du gène de la mélanoréguline chez le chat après réannotation, d'après Ensembl.



```

atatctaagagtgctgctcagaagggagttccaaatagatcgatcccaggcagagcttcc
ttcagctctgtcttcagttgtgggacacacagtcttaaattctaaatattagcaatacctg
gttacctcatttttacatactatccatttctagacccaagcccttgatatttcacatctgg
aatagcatctgtacactggaatgtttgacctccacttccttctcttctctttaatctgtt
tctggcgtcttggctgagagTTGTACCTGCCAGTGACCTTtagCACAGACTTGTGTCTC
TGGCTCTGCAGGCAATATGCACGGA
agaaggtcattgctgtactttctccattcagaagaggatttccaagatggagcagtgtct
gaattacagcttgcttctagccacagactgagaagtcagcctcaaaagttacttgccac
ttaagcaaggaggttgccaggaaatcatggttcattgtactgaaaagactttcagaacct
gtaggatttaccatagattgctgagaacaatggcgatatattttacttttacagcctttg
3'

```

Les codons de début (ATG) et de fin (TAA) sont surlignés.

L'**annexe 6** présente la séquence de MREG réannotée avec l'emplacement des amorces pour le séquençage et le pyroséquençage.

b) PCR

Les électrophorèses sur gel d'agarose nous ont permis de vérifier si les produits de PCR obtenus étaient conformes à ceux attendus, ce qui était le cas pour chacune des PCR effectuées. La figure 68 présente pour exemple la photographie du gel obtenu suite à la PCR des fragments contenant les SNP 1 à 4 abordés par la suite.

Figure 68 : Photographie du gel d'agarose après migration des fragments d'ADN par électrophorèse pour 4 chats et 4 SNP.

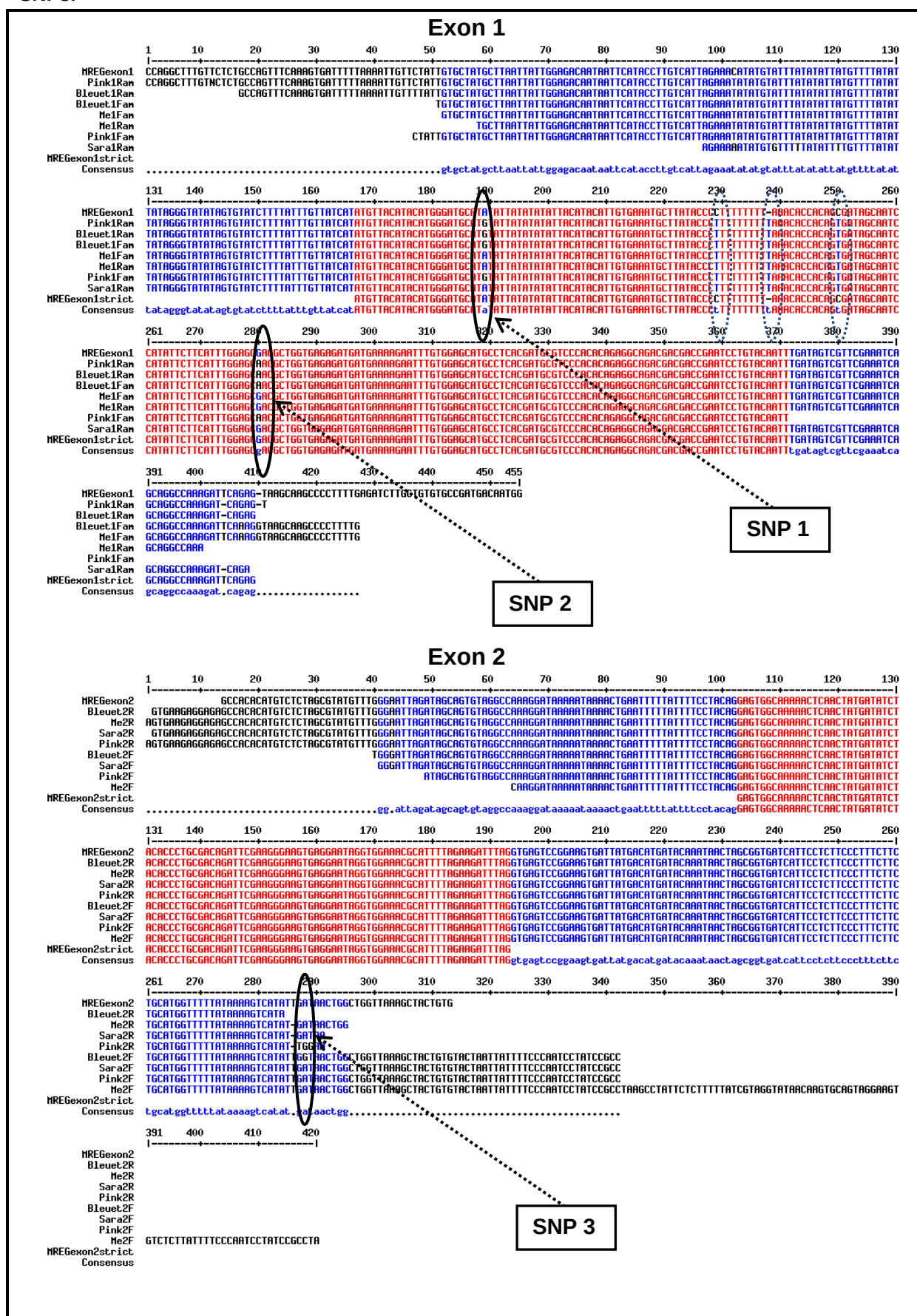


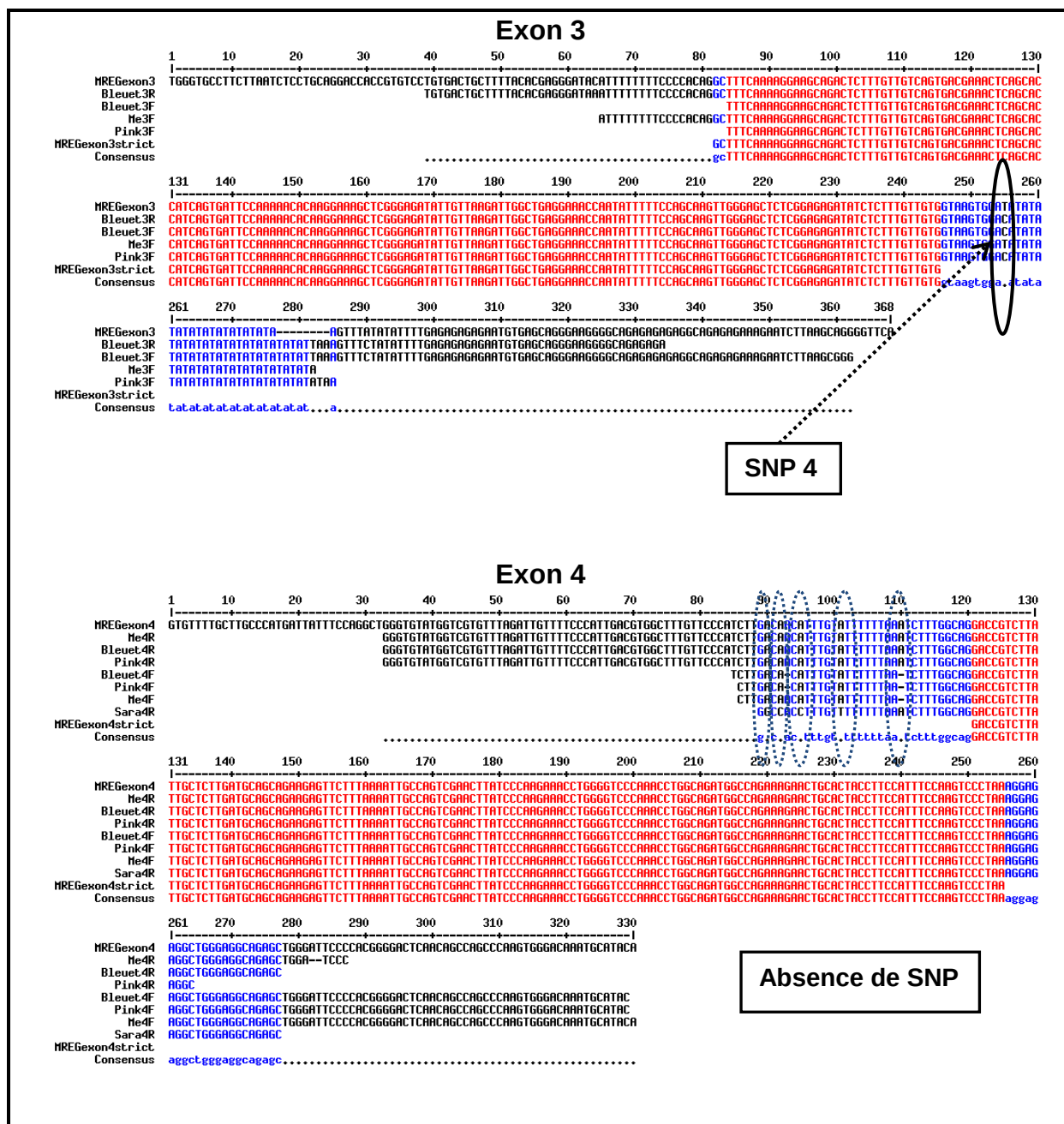
Photographie : Florence Bonvarlet.

c) Résultats du séquençage

Les séquences des 15 chats que nous avons sélectionnés pour être séquencés ont mis en évidence la présence de 4 SNPs parmi nos chats, pour le gène *MREG*. La figure 69 montre l'alignement des séquences de 4 des 15 chats séquencés. Deux d'entre eux étaient caramel, deux étaient bleus et la séquence de référence est la séquence d'un chat de race Abyssin et de couleur cinnamon (Ensembl). Pour être considéré comme SNP intéressant (parmi nos chats), la variation des bases doit concerner les chats caramel tout comme les chats bleus. Ainsi les variations entourées en pointillés ne constituent pas des SNPs pertinents pour nous puisque la différence observée est une différence entre le chat de référence et nos échantillons. Parmi les quatre SNPs identifiés, les SNP1 (A>G) et 2 (G>A) étaient situés dans des portions codantes de *MREG* (dans l'exon1) et les SNP3 (A>G) et 4 (T>C) dans les introns du gène.

Figure 69 : Extrait de l'alignement des séquences des exons de *MREG* et mise en évidence de 4 SNPs.





Légende :



SNP présent parmi nos chats : pertinent



SNP distinguant nos chats du chat Abyssin de référence : non pertinent

Le SNP2 c.346G>A était synonyme, c'est-à-dire que la variation de bases observée n'entraînait pas un changement d'acide aminé dans la protéine (une alanine). En revanche le SNP1 c.23A>G n'était pas synonyme, sa variation entraînait un changement du huitième acide aminé de la protéine: Y8C. Ainsi le codon sauvage (en référence à Ensembl) était TAT et codait la tyrosine (Y) alors que le codon muté TGT codait la cystéine (C).

Afin de déterminer si ce changement d'acide aminé pouvait avoir un impact sur la protéine, nous avons utilisé le logiciel PolyPhen qui prédit la gravité d'une mutation en faisant des comparaisons multiples de séquences homologues entre espèces et en interrogeant les bases de données de mutations délétères dans de nombreuses espèces animales.

La mutation Y8C de la mélanoréguline féline était prédite comme bénigne (Polyphen).

Parmi les 15 chats séquencés, les génotypes pour le SNP1 étaient les suivants :

- 10 chats caramel et abricot : 9 A/A, 1 A/G,
- 4 chats dilués : 3 A/A, 1 A/G,
- 1 chat non dilué : A/A,
- séquence de référence Ensembl : A/A.

Ce SNP ne semblait donc pas associé aux couleurs caramel et abricot.

En conclusion, le séquençage génomique des exons du gène *MREG* ne nous a pas permis de mettre en évidence de mutation responsable des couleurs caramel et abricot dans la phase codante et dans les jonctions intron-exon de ce gène.

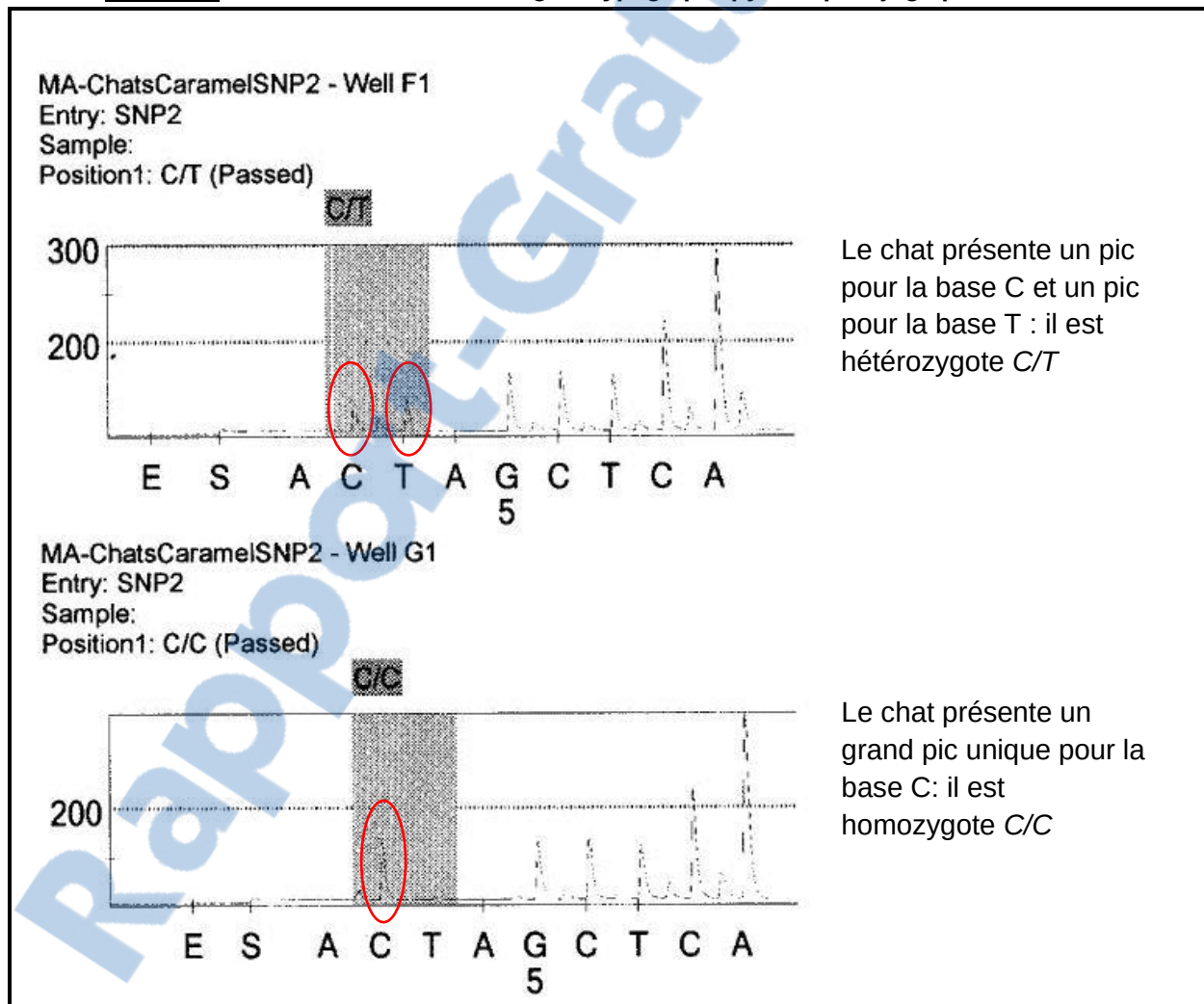
d) Résultats du génotypage par pyroséquençage

Afin de déterminer si le gène *MREG* pouvait tout de même être un candidat pour les couleurs caramel et abricot et contenir une mutation dans une région que nous n'aurions pas séquencée (introns, promoteur, 5' et 3' UTR), nous avons décidé d'effectuer une étude d'association à l'aide des SNPs identifiés grâce au séquençage génomique précédent.

Nous avons donc génotypé notre cohorte de 95 chats caramel, abricot, dilués et non dilués, pour les 4 SNPs identifiés dans *MREG*, à l'aide de la technique de pyroséquençage.

La figure 70 explique le principe de lecture des résultats du pyroséquençage.

Figure 70 : Extrait des résultats de génotypage par pyroséquençage pour le SNP2.



Les résultats sont présents sous forme des bases T et C car le séquençage a été effectué en reverse (le SNP2 est une variation A/G).

Le tableau 17 présente les résultats obtenus suite au génotypage par pyroséquençage.

Tableau 17 : Résultats du génotypage par pyroséquençage pour les SNP1, SNP2, SNP3 et SNP4 situés dans le gène *MREG*.

Chat N°	Couleur	Race	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
1	Caramel ?	Balinois	A/G	C/C	A/A	T/T
2	Caramel ?	Balinois	A/A	?	A/G	T/C
3	Caramel/Abricot	Balinois	?	?	?	T/T
4	Caramel/Abricot	Balinois	G/G	C/C	A/A	T/T
5	Caramel/Abricot	Balinois	A/A	C/C	A/G	?
6	Caramel/Abricot	Balinois	A/A	C/C	A/G	T/C
7	Caramel/Abricot	Balinois	A/G	C/C	A/G	T/C
8	Caramel/Abricot	Balinois	A/A	C/C	A/G	T/C
9	Caramel/Abricot	Balinois	A/G	C/C	A/A	T/T
10	Caramel/Abricot	Birman	A/G	C/C	?	T/C
11	Caramel/Abricot	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
12	Caramel/Abricot	Birman	G/G	?	A/A	?
13	Caramel/Abricot	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
14	Caramel/Abricot	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
15	Caramel/Abricot	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
16	Caramel/Abricot	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
17	Caramel ?	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
18	Caramel/Abricot	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
19	Caramel/Abricot	Birman	G/G	C/C	A/A	T/C
20	Caramel/Abricot	Birman	G/G	C/C	A/A	?
21	Caramel/Abricot	Birman	G/G	C/C	A/A	T/C
22	Caramel/Abricot	Birman	A/G	C/C	A/A	?
23	Caramel/Abricot	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
24	Caramel ?	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
25	Caramel/Abricot	Birman	G/G	C/C	?	T/C
26	Caramel/Abricot	Birman	?	C/T	A/G	?
27	Caramel/Abricot	British	A/G	C/C	A/G	T/C
28	Caramel/Abricot	British	?	C/C	A/G	T/C
29	Caramel/Abricot	British	A/A	C/C	A/A	?
30	Caramel ?	British	A/G	C/C	A/G	T/C
31	Caramel ?	Burmese	A/G	C/T	A/G	T/C
32	Caramel ?	Oriental	G/G	C/T	A/G	T/C
33	Caramel ?	Oriental	G/G	C/T	A/G	T/C
34	Caramel/Abricot	Oriental	A/A	C/C	A/A	?
35	Caramel/Abricot	Oriental	G/G	C/C	A/A	?
36	Caramel/Abricot	Oriental	A/G	C/C	?	T/T
37	Caramel/Abricot	Oriental	A/A	C/C	A/A	T/T

38	Caramel/Abricot	Oriental	?	C/C	A/A	T/C
39	Caramel/Abricot	Oriental	A/G	C/C	A/G	T/C
40	Caramel/Abricot	Oriental	A/A	C/C	A/G	T/C
41	Caramel/Abricot	Oriental	G/G	T/T	G/G	C/C
42	Caramel/Abricot	Oriental	A/G	C/C	A/G	T/C
43	Caramel/Abricot	Oriental	G/G	C/T	A/G	T/C
44	Caramel/Abricot	Oriental	G/G	?	A/G	T/C
45	Caramel/Abricot	Oriental	A/A	C/C	A/G	T/C
46	Caramel/Abricot	Oriental	A/A	C/T	A/G	T/C
47	Caramel/Abricot	Oriental	A/G	C/T	G/G	?
48	Caramel/Abricot	Oriental	G/G	T/T	G/G	C/C
49	Caramel/Abricot	Oriental	G/G	T/T	G/G	T/C
50	Caramel/Abricot	Siamois	A/G	C/C	A/A	T/T
51	Caramel/Abricot	Siamois	A/A	C/C	A/A	T/T
52	Caramel/Abricot	Siamois	A/A	C/C	A/A	T/T
53	Caramel/Abricot	Siamois	G/G	C/T	A/G	T/C
54	Caramel/Abricot	Siamois	A/A	C/C	A/G	T/C
55	Caramel/Abricot	Siamois	A/G	C/C	A/G	T/C
56	Caramel/Abricot	Tonkinois	A/A	C/C	?	?
57	Caramel/Abricot	Tonkinois	A/A	C/C	?	T/C
58	Caramel/Abricot	Tonkinois	A/A	C/C	A/A	T/T
59	Contrôle dilué	Balinois	A/A	C/C	?	T/T
60	Contrôle dilué	Balinois	A/A	?	?	?
61	Contrôle dilué	Balinois	A/G	C/C	A/G	T/C
62	Contrôle dilué	Balinois	?	C/T	G/G	T/C
63	Contrôle dilué	Birman	?	C/C	?	T/C
64	Contrôle dilué	Birman	G/G	C/C	?	T/C
65	Contrôle dilué	Birman	A/G	C/C	?	T/C
66	Contrôle dilué	Birman	A/G	C/T	A/G	T/C
67	Contrôle dilué	Birman	?	C/T	A/G	?
68	Contrôle dilué	Birman	A/G	C/T	A/A	T/T
69	Contrôle dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
70	Contrôle dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
71	Contrôle dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
72	Contrôle dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
73	Contrôle dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
74	Contrôle dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
75	Contrôle dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	?
76	Contrôle dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
77	Contrôle dilué	British	A/G	C/T	A/G	T/C
78	Contrôle dilué	Oriental	A/A	C/C	A/A	T/T
79	Contrôle dilué	Oriental	G/G	C/T	A/G	T/C
80	Contrôle dilué	Siamois	G/G	C/T	?	T/C

81	Contrôle dilué	Tonkinois	A/A	C/C	A/A	?
82	Contrôle non dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
83	Contrôle non dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
84	Contrôle non dilué	Birman	A/A	C/C	A/A	T/T
85	Contrôle non dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
86	Contrôle non dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
87	Contrôle non dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
88	Contrôle non dilué	Birman	A/G	C/C	A/A	T/C
89	Contrôle non dilué	Burmese	A/A	C/C	A/A	T/T
90	Contrôle non dilué	Oriental	?	C/T	G/G	C/C
91	Contrôle non dilué	Oriental	A/G	C/T	A/G	T/C
92	Contrôle non dilué	Oriental	?	?	A/A	T/T
93	Contrôle non dilué	Siamois	A/A	C/C	A/G	T/C
94	Contrôle non dilué	Tonkinois	A/A	?	A/A	?
95	Contrôle non dilué	Tonkinois	A/A	?	A/G	T/C

Le principe d'une étude d'association repose sur la comparaison des fréquences des allèles d'un marqueur chez des sujets témoins, ici les chats dilués, et des sujets cas, ici les chats caramel et abricot.

Nous avons donc comparé, à l'aide de tests du χ^2 les fréquences alléliques, pour chaque SNP pris individuellement, chez les chats dilués et les chats caramel et abricot. Les chats non dilués n'étaient pas exploitables (statut inconnu pour caramel et abricot), ils ont été écartés de l'analyse. De même, les chats dont la couleur caramel ou abricot n'était pas certaine (? dans le tableau 17) ont été écartés de l'analyse.

Pour chaque SNP il existait 3 catégories de génotypes. Tous les chats n'ont pas donné un résultat exploitable en pyroséquençage. Ainsi, pour le SNP1 nous avons 66 génotypes exploitables (46 caramel/abricot et 20 dilués), pour le SNP2 nous en avons 69 (47 caramel/abricot et 22 dilués), 61 pour le SNP3 (44 caramel/abricot et 17 dilués) et 59 pour le SNP4 (40 caramel/abricot et 19 dilués).

Les résultats de l'analyse furent les suivants :

- SNP1 : association statistiquement non significative, $p=0,90$,
- SNP2 : association statistiquement non significative, $p=0,32$,
- SNP3 : association statistiquement non significative, $p=0,98$,
- SNP4 : association statistiquement non significative, $p=0,96$.

L'analyse des résultats de génotypage des SNP n'a donc pas permis de mettre en évidence une association entre les couleurs caramel et abricot et la région du gène *MREG*.

Il semblait donc que la mutation responsable des couleurs caramel et abricot ne se situe pas dans le gène codant la mélanoréguline. *Dilute modifier* ne serait donc pas l'analogue félin de *dilute suppressor* de la souris.

III- Caractérisation à la loupe binoculaire et en microscopie électronique de poils caramel et abricot

L'observation de poils à la loupe binoculaire et en microscopie électronique à transmission a été réalisée afin de vérifier s'il existait des différences structurelles significatives entre les poils caramel et abricot, les poils dilués et les poils de couleur de base.

A- Matériel et méthodes

a) Echantillons utilisés

Pour observer les poils, il a été choisi d'utiliser uniquement des poils de chats caramel ou abricot reconnus officiellement comme tels, unicolores et sans motif afin de ne pas compliquer l'observation ni biaiser l'interprétation. Parmi tous les prélèvements qui nous sont parvenus, seuls un chat oriental caramel et un chat oriental abricot répondaient à ces exigences. Les poils de ces deux chats ont été comparés à des poils unis de couleur bleu, noir, crème et roux.

b) Préparation des poils pour l'observation à la loupe binoculaire

Le protocole de préparation des poils en vue de l'observation à la loupe binoculaire a été élaboré et adapté à partir de la publication de Russell (1946). Les poils ont été successivement trempés dans un bain d'éthanol 100% pendant deux jours puis dans une solution composée à 50% d'éthanol 100% et 50% de xylène pendant deux jours, et enfin deux jours dans le xylène. Le montage a été effectué dans de l'eukitt.

c) Préparation des poils pour l'observation au microscope électronique à transmission

L'observation des poils en microscopie électronique à transmission a été réalisée grâce à un partenariat avec l'équipe technique du laboratoire de microscopie électronique, microanalyse et microimagerie de l'Unité du LIOAD -Laboratoire d'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire- INSERM UMRS 791 de Nantes. C'est notamment Mr Pilet, responsable scientifique adjoint et responsable technique de la plate-forme qui s'est chargé de la préparation et de l'observation des poils caramel et bleu. Il nous a ensuite communiqué ses observations.

B- Résultats

a) Résultat des observations à la loupe binoculaire

Après préparation, les poils ont été observés à la loupe binoculaire au grossissement maximum X11,25. Les figures 71 à 76 sont un extrait des clichés ayant été effectués lors de cette observation.

Figure 71 : Poil noir observé à la loupe binoculaire X11,25.



Photographie : ©Florence Bonvarlet & Marie Abitbol, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

La pigmentation est diffuse et homogène pour le poil de couleur noire.

Figure 72 : Poils bleus observés à la loupe binoculaire X11,25.



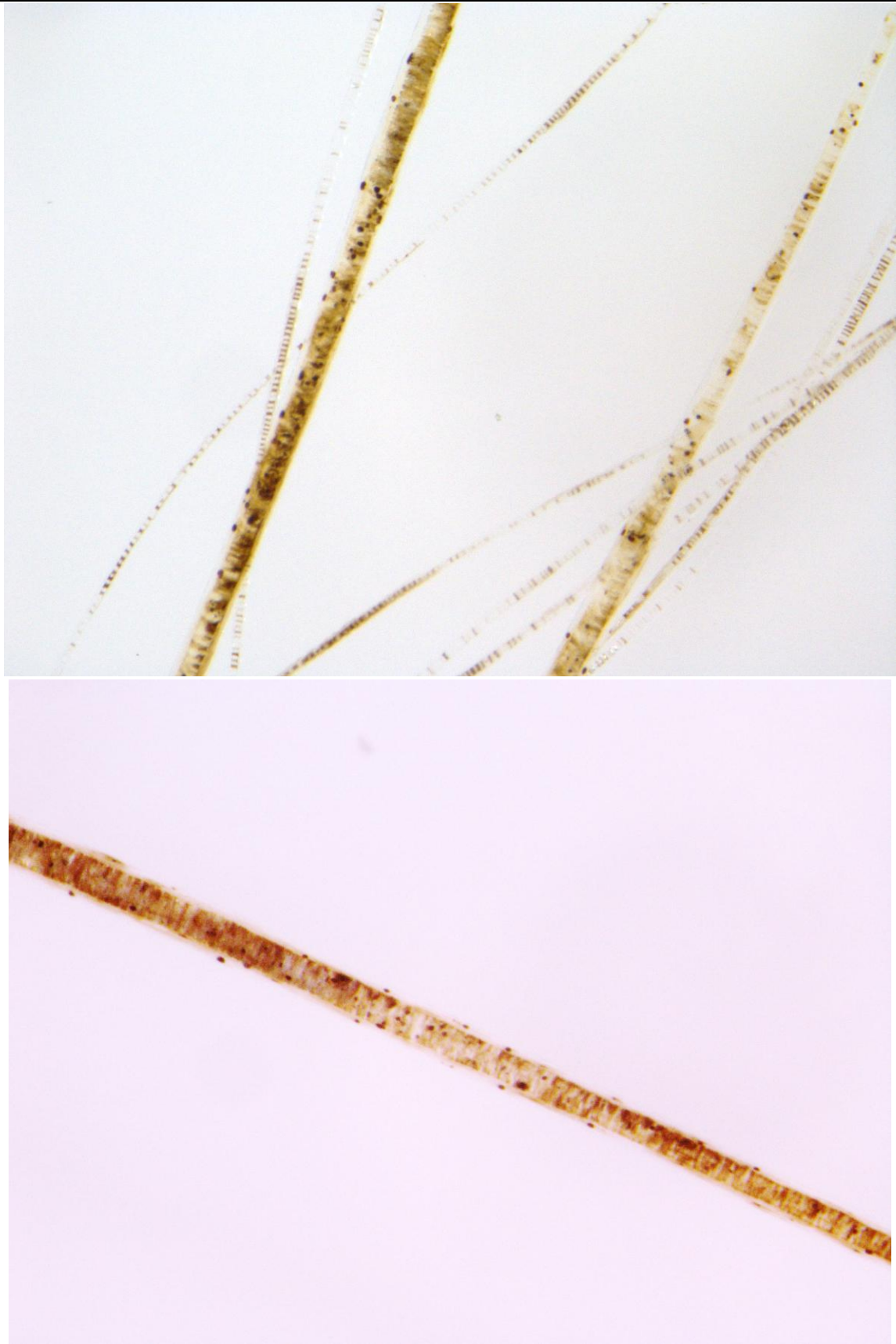
En rouge sont entourés des amas de pigments.

Photographie : ©Florence Bonvarlet & Marie Abitbol, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

Les poils de couleur diluée étaient caractérisés par la présence de pigments regroupés en amas (entourés en rouge sur la figure 72). La répartition n'était pas homogène, il y avait des zones plus claires et des zones où le pigment s'agrégeait en forme ovalaires, parfois étendues (macromélanosomes), où le pigment semblait laisser une trainée.

Pour les poils caramel (figure 73), nous avons observé également un regroupement des pigments mais celui-ci était beaucoup plus marqué et régulier. Alors que dans le poil bleu les amas de pigments étaient ovalaires et étendus, dans le poil caramel, l'agrégation pigmentaire semblait plus régulière, avec des amas de pigments de forme ronde et régulière. On ne retrouvait pas les trainées de pigment visibles dans le poil bleu. Il semblerait donc qu'il y ait une différence structurelle entre les poils de couleur diluée et les poils caramel.

Figure 73 : Poils caramel observés à la loupe binoculaire X11,25.



Photographie : ©Florence Bonvarlet & Marie Abitbol, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

La figure 74 présente un poil roux. La couleur est uniforme, il n'y avait pas d'amas de pigments visibles.

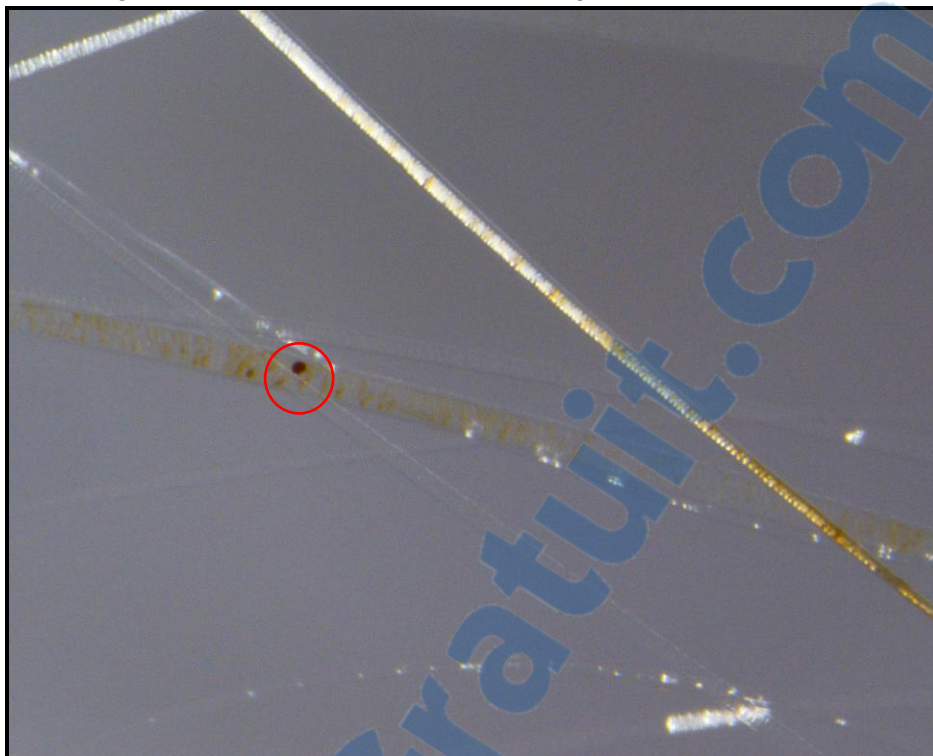
Figure 74 : Poil roux observé à la loupe binoculaire X11,25.



Photographie : ©Florence Bonvarlet & Marie Abitbol, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

Dans le poil crème, nous avons observé à nouveau ce qui est caractéristique des poils dilués : les amas pigmentaires (figure 75).

Figure 75 : Poil crème observé à la loupe binoculaire X11,25.



Photographie : ©Florence Bonvarlet & Marie Abitbol, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

Tout comme le poil caramel, le poil abricot présentait des amas pigmentaires mais dont l'aspect était uniforme, rond et de taille régulière (figure 76).

Figure 76 : Poil abricot observé à la loupe binoculaire X11,25.



Photographie : ©Florence Bonvarlet & Marie Abitbol, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

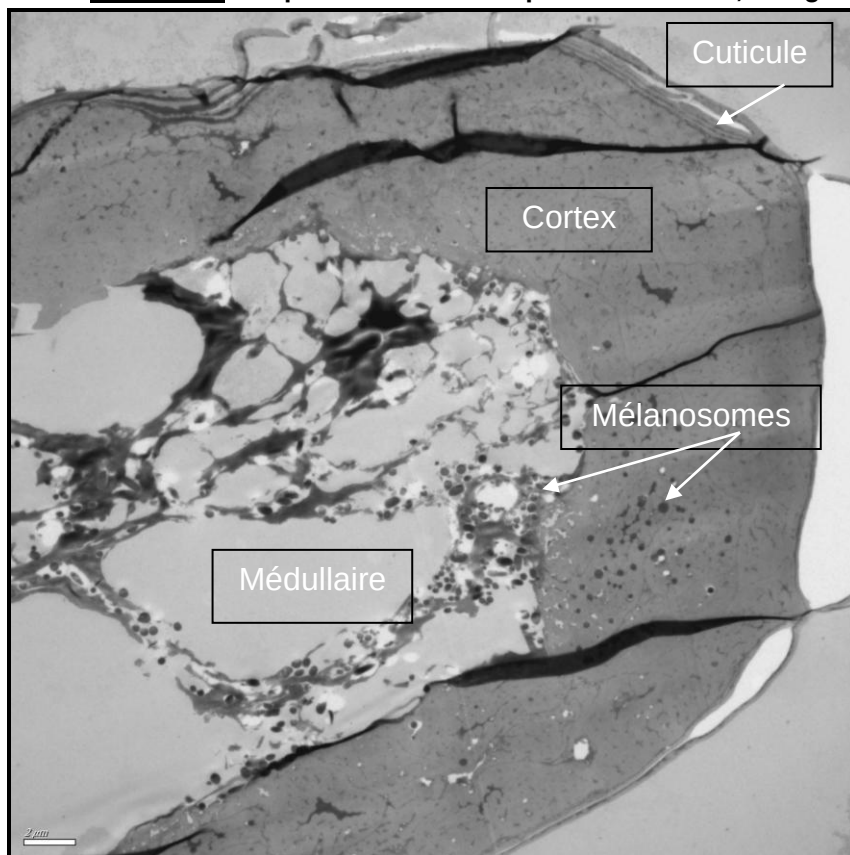
Nous avons donc observé une différence structurale concernant la répartition et l'organisation des pigments entre les poils caramel et abricot et les poil de couleur diluée. Les poils de couleur caramel et abricot présenteraient des amas mélaniques en plus grande quantité, répartis sur toute la longueur du poil, de forme ronde et régulière et de taille modérée. Au contraire, les poils de couleur diluée présentent des amas de grande taille, ovalaires, de forme irrégulière et effilée.

b) Résultat des observations en microscopie électronique à transmission

Seules des coupes transversales de poils bleu et caramel ont pu être réalisées pour des raisons techniques.

- Poil de chat bleu (figures 77 à 81)

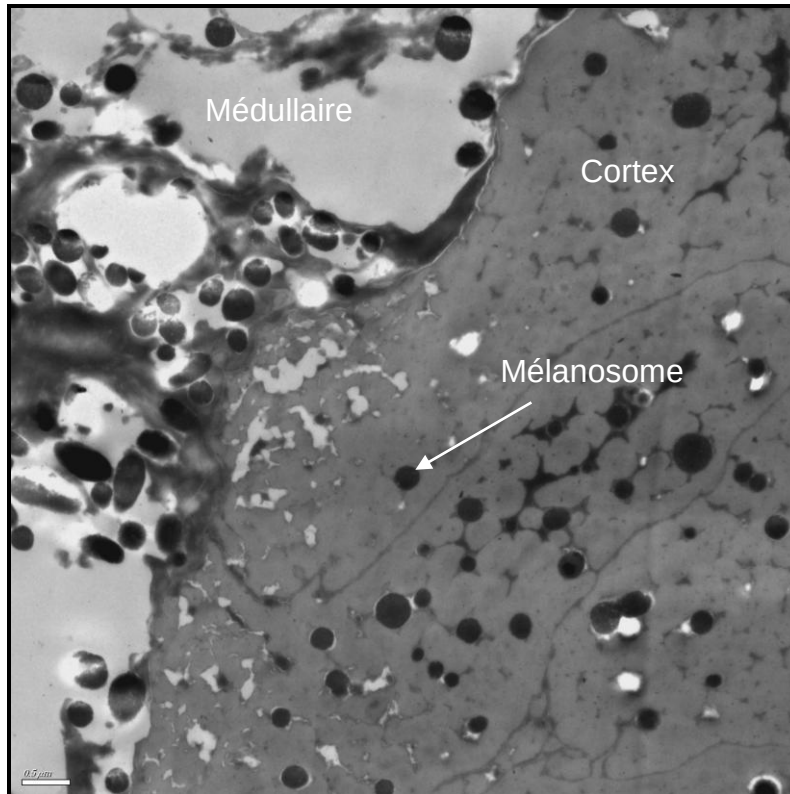
Figure 77 : Coupe transversale de poil de chat bleu, vue générale.



Barre d'échelle : 2 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la répartition des grains de mélanine dans le cortex et la médulla.

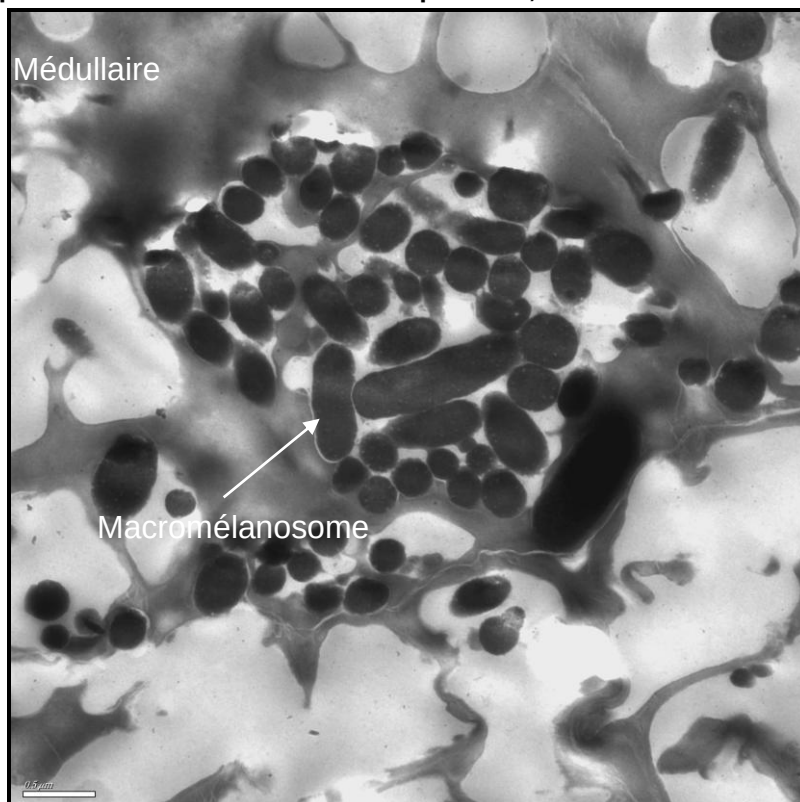
Figure 78 : Détail sur la jonction médullaire-cortex du poil bleu, coupe transversale.



Barre d'échelle : 0,5 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de mélanosomes dans les deux zones du poil.

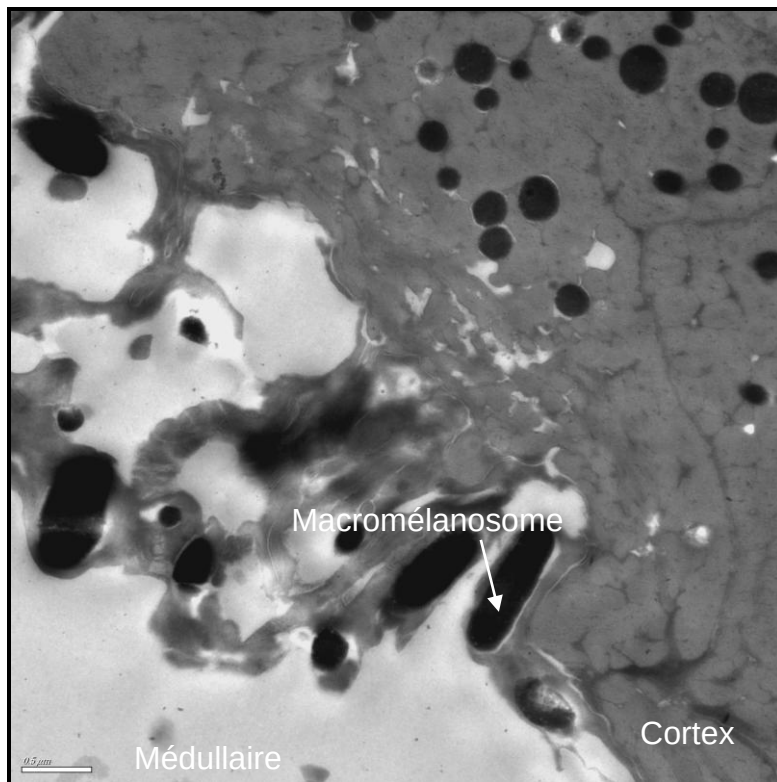
Figure 79 : Coupe transversale de médulla de poil bleu, détail sur les macromélanosomes



Barre d'échelle : 0,5 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de gros mélanosomes non sphériques : les macromélanosomes et de l'aggrégation globale des malanosomes.

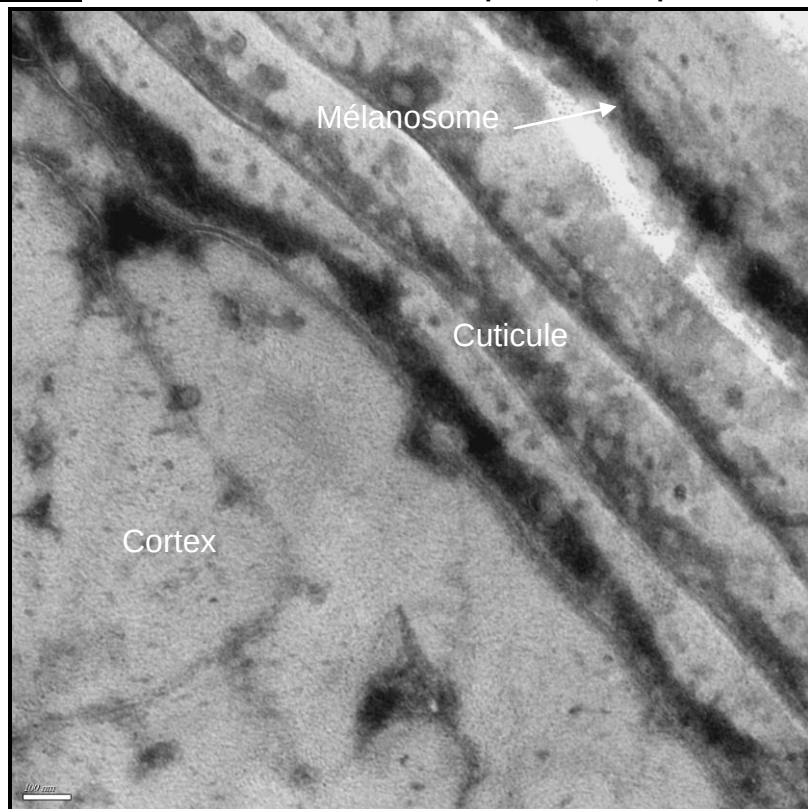
Figure 80 : Macromélanosomes à la jonction médullaire/cortex d'un poil bleu, coupe transversale.



Barre d'échelle : 0,5 μm . Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de macromélanosomes allongés.

Figure 81 : Jonction cortex-cuticule d'un poil bleu, coupe transversale.

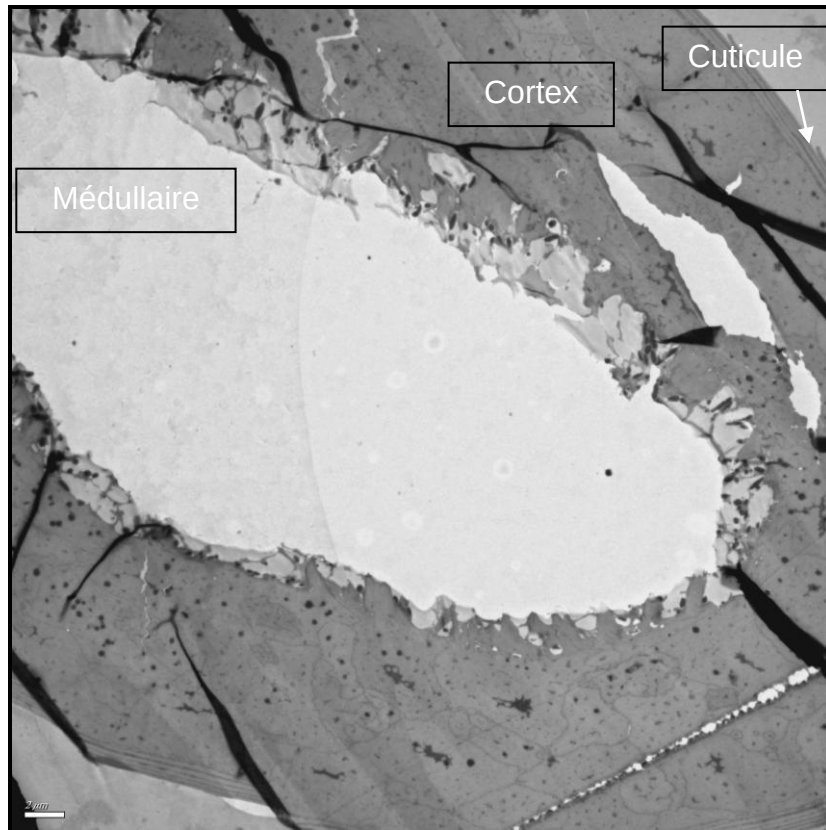


Barre d'échelle : 100 nm. Photographie : ©Pilet. Noter la présence des mélanosomes dans le cortex mais également dans la cuticule du poil.

Nous avons donc constaté la présence de mélanosomes dans les trois couches du poil : medulla, cortex mais également cuticule, chez le chat bleu. De plus, ces mélanosomes présentaient parfois une agrégation en amas. Enfin, la présence de macromélanosomes de grande taille et allongés était caractéristique.

➤ Chat caramel (figures 82 à 85)

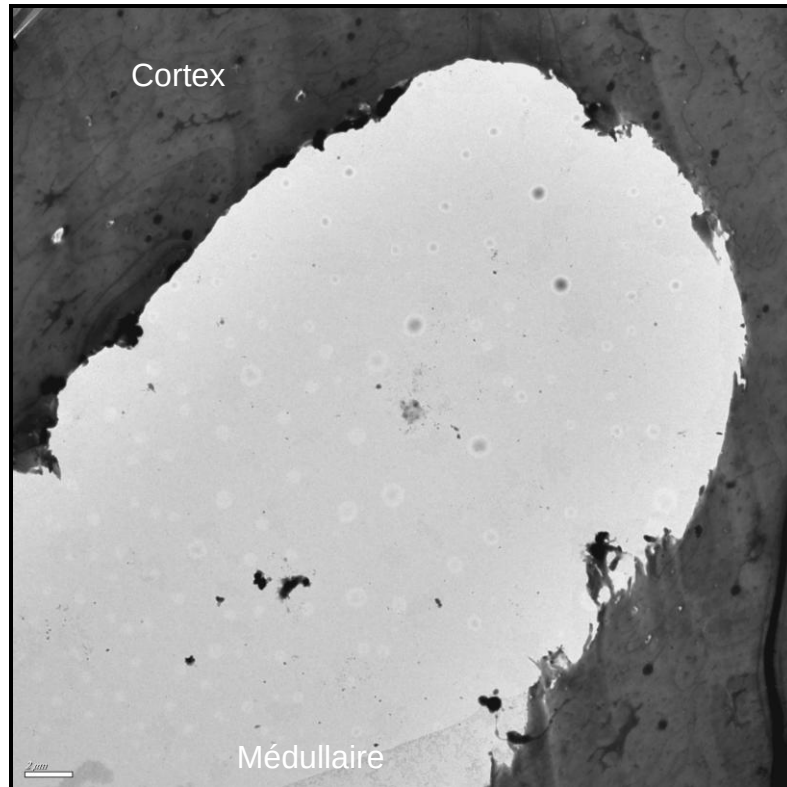
Figure 82 : Vue générale en coupe transversale de poil caramel.



Barre d'échelle : 2 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de mélanosomes distribués dans le cortex. La médullaire est vide à l'endroit de la coupe.

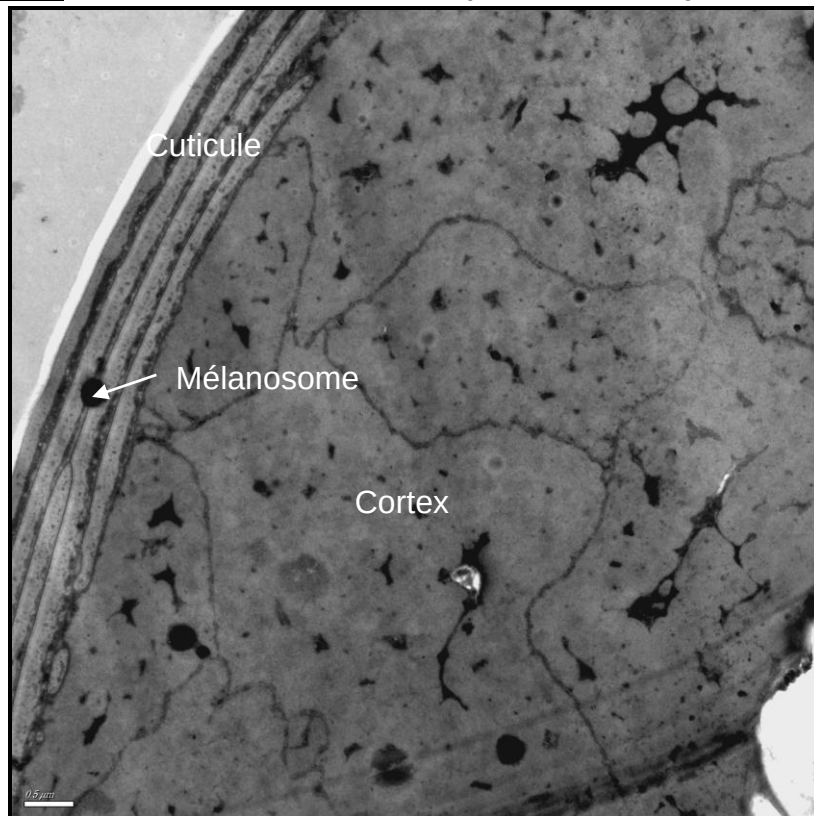
Figure 83 : Jonction médullaire-cortex en coupe transversale de poil caramel



Barre d'échelle : 2 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de seulement quelques mélanosomes épars dans le cortex. La médullaire est vide à l'endroit de la coupe.

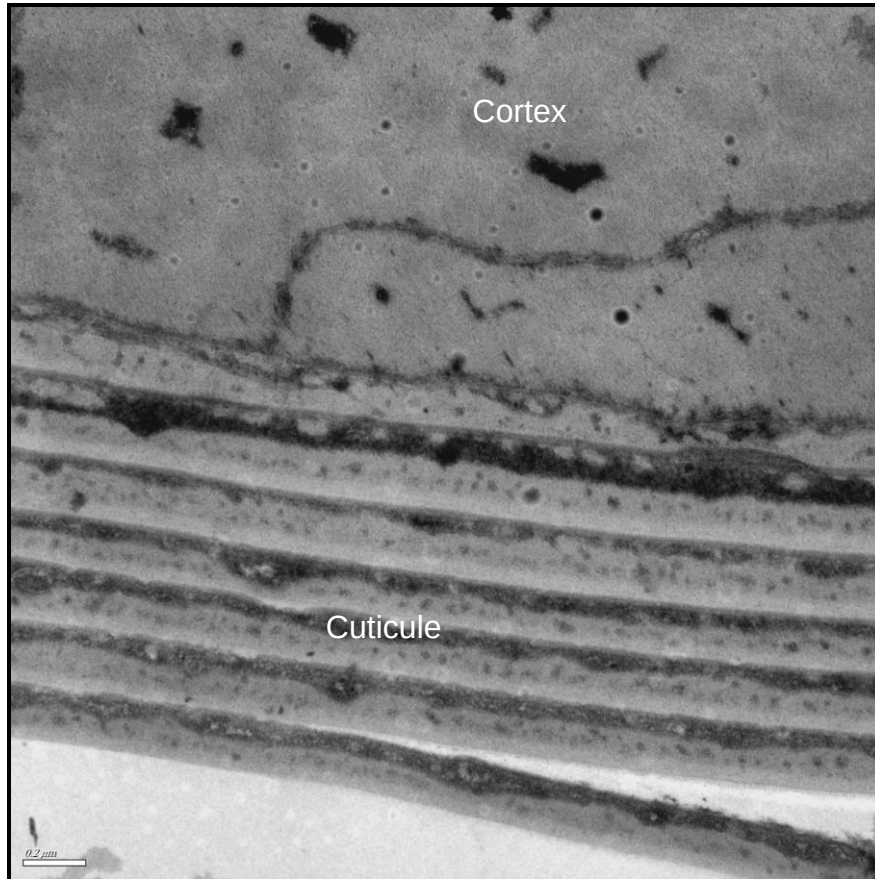
Figure 84 : Jonction cortex-cuticule d'un poil caramel, coupe transversale.



Barre d' échelle : 0,5 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de mélanosomes dans le cortex, mais également dans la cuticule.

Figure 85 : Détail de la cuticule d'un poil caramel, coupe transversale.



Barre d'échelle : 0,2 µm. Photographie : ©Pilet.

Noter la présence de petits mélanosomes dans le cortex et la cuticule.

Nous avons observé que les pigments semblaient plus groupés et avaient une forme différente dans les poils bleus comparés aux poils caramel. Pour les poils bleus, nous avons retrouvé l'observation qui avait été faite à la loupe binoculaire, c'est-à-dire que l'on distinguait de nombreux mélanosomes ou macromélanosomes agglomérés en paquets. Ceux-ci étaient très présents dans la médulla et le cortex. Pour les poils caramel, les mélanosomes étaient plus rares, ils étaient de forme beaucoup plus régulière, sphérique, et semblaient moins agrégés.

DISCUSSION

Le but de cette étude était triple : mettre en évidence un mode de transmission des caractères caramel et abricot, vérifier si *dilute modifier* du chat pouvait être l'analogue de *dilute suppressor* de la souris, et mettre en évidence d'éventuelles différences structurales entre les poils de couleur diluée et les poils caramel et abricot.

Concernant le mode de transmission, il semble très probable que celui-ci soit autosomique dominant (à expressivité variable) chez les chats étudiés. Cependant, l'hypothèse d'un mode de transmission autosomique récessif avec phénomène de pseudodominance n'a pas pu être exclu formellement, même s'il est très peu probable, une population de chats caramel et abricot hétérozygotes très grande ne semblant que très peu probable compte tenu de la rareté de ces couleurs. Le recrutement d'un nombre plus important de chatteries avec des données fiables de généalogie permettrait de tester statistiquement, sur un plus grand nombre de chats que nous l'avons fait, le mode de transmission.

En analysant la littérature sur les mutations de pelage dans diverses espèces de mammifères, en particulier la souris, nous avons retenu comme gène candidat principal pour les couleurs caramel et abricot félines, le gène *MREG* qui code la mélanoréguline et est présent au locus *dilute suppressor* (*dsu*). Lorsque ce gène est muté chez la souris, il provoque une modification, voire une suppression du phénotype dilué de pelage de trois mutants : *dilute*, *ashen* et *leaden*. Or la dilution de la couleur de base chez le chat est homologue de la mutation *leaden* de la souris (gène *MLPH*). Le gène *MREG* nous a donc semblé un candidat prioritaire.

Le séquençage génomique des exons et jonctions intron-exon du gène *MREG*, chez des chats caramel et abricot et des chats dilués contrôles n'a mis en évidence aucune mutation causale. Nous avons cependant identifié 4 SNPs dont un SNP non synonyme dans l'exon 1 du gène (Y8C) qui nous ont permis d'effectuer une étude d'association. Nous n'avons mis en évidence aucune association entre le phénotype *dilute modifier* félin et les 4 SNPs. Nous en avons déduit que le locus *Dm* du chat n'était pas homologue du locus *dsu* de la souris.

Il y avait cependant des limites à notre étude :

- Tout d'abord nous avons eu des difficultés à évaluer si un prélèvement reçu provenait d'un chat qui était réellement caramel ou abricot. Il y avait en effet une incertitude sur le phénotype de certains animaux, dont la couleur n'avait pas été évaluée au cours d'une exposition féline mais uniquement par l'éleveur ou le propriétaire. Lors du séquençage de *MREG*, les chats dont l'ADN a été séquençé étaient ceux sur lesquels le doute était moindre (chat avec un pedigree caramel ou abricot provenant d'un pays où la modification

était reconnue, chat vu en exposition), mais, pour l'étude d'association, il a fallu prendre en compte tous les individus, ce qui a pu fausser l'étude.

- Le nombre de races sur lequel nous avons travaillé était élevée. En effet il existe des variants intraraciaux et la mutation *Dm* pourrait être différente selon la race étudiée. Le recrutement d'un grand nombre de chats et l'analyse séparée de chaque race permettrait de s'affranchir d'une éventuelle hétérogénéité génétique.

Enfin, si une mutation dans le gène de la mélanoréguline avait été à l'origine des couleurs caramel et abricot du chat, nous nous serions attendu à une distribution des mélanosomes plus ou moins restaurée au sein du poil et donc assez homogène, ce qui n'a pas été observé à la loupe binoculaire ni au microscope électronique à transmission. Au contraire, les mélanosomes étaient regroupés en amas plus petits et de forme ronde très régulière sur les échantillons observés. D'autre part, nous n'avons pu observer que les poils de deux chats caramel et abricot avéré. Nos résultats sont donc préliminaires et demandent à être confirmés sur un plus grand nombre d'observations.

A l'avenir, la suite de ce travail pourrait être de s'intéresser à la candidature d'autres gènes pour le locus *Dm* félin.

On ne peut exclure la possibilité d'une double mutation au sein des gènes codant les protéines du complexe RAB27/MLPH/MyosinVa. Les chats de couleur diluée sont mutés dans le gène codant la mélanophiline (*MLPH*). Les chats caramel et abricot pourraient être doublement mutés dans les gènes codant la mélanophiline et RAB27 ou la mélanophiline et la Myosine Va. Ceci pourrait expliquer la persistance des amas mélaniques à l'observation microscopique. De plus, les souris doublement mutées pour le complexe RAB27/MLPH/MyosinVa ont un phénotype très proche des souris mutées uniquement pour l'une des protéines de ce complexe (www.informatics.jax.org/image/MGI:3587262).

On peut également penser à une mutation d'un gène codant une molécule participant aux phénomènes de fission et de fusion des mélanosomes, ce qui expliquerait l'aspect plus petit et régulier des amas mélaniques dans le poil caramel par rapport aux poils de couleur diluée. Les molécules impliquées dans ces phénomènes de fusion et de fission ne sont pas encore bien connues. Seule la protéine *LYST*, de la famille des *BEACH* (*BEige And CHediak*) a été mise en cause dans le syndrome de Chediak-Higashi, dans lequel une mutation dans le gène *LYST* se caractérise, entre autres, par la formation de mélanosomes géants hypomélanisés, conséquence d'une diminution des phénomènes de fission (Durchfort *et al.*, 2012). Le gène *LYST* ne constitue pas un gène candidat évident pour notre étude puisqu'une mutation dans ce gène conduit à des macromélanosomes hypomélanisés et un phénotype plus clair, ce qui n'est pas le

cas chez les chats caramel et abricot. Cependant, une mutation moins sévère que celle conduisant au syndrome de Chediak-Higashi pourrait être responsable d'une modification de la couleur, sans les aspects délétères du syndrome. Notons également que l'origine de la modification *Dm* remonterait à des chats Persan, et que le syndrome de Chediak-Higashi a été décrit dans cette race. Une exploration du gène *LYST* reste donc à envisager. De plus, on peut envisager qu'une autre molécule de la famille des BEACH, participant à la régulation des phénomènes de fusion et de fission des vésicules, soit impliquée.

Enfin, une mutation dans le gène codant *SLC7a11*, régulateur majeur de la phaeomélanogenèse, peut être envisagée. Une modification du ratio eumélanine/phaeomélanine dans de discrètes proportions pourrait éventuellement être à l'origine des différences de teinte subtiles observées entre les chats caramel et abricot et les chats de couleur diluée, sans toutefois expliquer les différences entre chats caramel et abricot et les chats dilués concernant les agrégats de mélanosomes.

CONCLUSION

Les couleurs caramel et abricot, officiellement mentionnées dans les années 1970 en Grande Bretagne, sont désormais reconnues dans quelques fédérations félines à travers le monde et pour diverses races dont le Siamois, l'Oriental, le Balinaï, le Mandarin et le Sacré de Birmanie. Sous la dépendance d'un allèle supposé dominant, les robes bleue, lilas, faon, et crème deviennent caramel pour les trois premières et abricot pour le crème.

Cependant, ces couleurs font l'objet d'une controverse dans la plupart des pays, où partisans et détracteurs du caramel et de l'abricot s'affrontent : véritables couleurs à part entière sous la dépendance d'un gène unique pour les uns, simple reflet de l'expressivité variable des couleurs diluées sous l'influence des polygènes pour les autres.

Le but de cette thèse était de faire une description de ces couleurs, de vérifier s'il était possible de mettre en évidence un mode de transmission, d'essayer de trouver leur support génétique, et de comparer la structure de poils caramel et abricot à des poils de couleur diluée.

A l'issue de notre étude, il semble très probable que ces couleurs soient transmises selon un mode autosomique dominant à expressivité variable.

Notre étude moléculaire visait essentiellement à tester une hypothèse : la mutation *dilute modifier* serait-elle l'homologue félin de la mutation *dilute suppressor* de la souris, caractérisée par la restauration de la couleur initiale chez des souris de robe diluée. A l'issue de nos expériences, nous avons conclu que le gène de la mélanoréguline mis en cause chez les souris *dilute suppressor*, n'était pas impliqué dans le phénotype *dilute modifier*.

L'étude microscopique de poils caramel et abricot a montré la présence de mélanosomes agrégés, déjà décrits dans les poils dilués. Cependant, les mélanosomes semblaient plus petits, plus nombreux et d'une forme sphérique beaucoup plus régulière dans les poils caramel et abricot que dans les poils dilués. Ces résultats préliminaires peuvent ainsi nous orienter vers l'étude ultérieure d'autres gènes candidats.

ANNEXES

<u>Annexe 1</u> : Races reconnues par l' ACF et couleurs autorisées dans ces races	162
<u>Annexe 2</u> : Standards des robes caramel et abricot pour le SACC	167
<u>Annexe 3</u> : Standards des robes caramel et abricot chez les Siamois et Balinais pour le GCCF	173
<u>Annexe 4</u> : Document destiné aux éleveurs concernant l'étude	176
<u>Annexe 5</u> : Protocole d'extraction d' ADN à partir de brossettes buccales du Maxwell® 16 Buccal Swab LV DNA Purification Kit.....	178
<u>Annexe 6</u> : Séquence de <i>MREG</i> réannotée avec surlignement des amorces pour le séquençage moléculaire et mise en évidence des SNPs	187

Annexe 1 : Races reconnues par l' ACF et couleurs autorisées dans ces racesSource groupe 1 : <http://www.acf.asn.au/notices/notices/standards/Group%20One%20Colours.pdf>Source groupe 2 : <http://www.acf.asn.au/notices/notices/standards/Group%20Two%20Colours.pdf>Source groupe 3 : <http://www.acf.asn.au/notices/notices/standards/Group%20Three%20Colours.pdf>**BREEDS, COLOURS & PATTERNS – GROUP 1****BIRMAN**

Birman - General

Seal Point, Blue Point, Chocolate Point, Lilac Point, Red Point, Cream Point, Caramel Point, Apricot Point

Tabby Point – Description

Seal Tabby Point, Blue Tabby Point, Chocolate Tabby Point, Lilac Tabby Point, Red Tabby Point, Cream Tabby Point, Caramel Tabby Point, Apricot Tabby Point

Tortie Point – Description

Seal Tortie Point, Blue Tortie Point, Chocolate Tortie Point, Lilac Tortie Point, Caramel Tortie Point, Seal Tortie Tabby Point, Blue Tortie Tabby Point, Chocolate Tortie Tabby Point, Lilac Tortie Tabby Point, Caramel Tortie Tabby Point

Silver Tabby Point—Description

Seal Silver Tabby Point, Blue Silver Tabby Point, Chocolate Silver Tabby Point, Lilac Silver Tabby Point, Red Silver Tabby Point, Cream Silver Tabby Point, Caramel Silver Tabby Point, Apricot Silver Tabby Point

Silver Tortie Tabby Point—**Description**

Seal Silver Tortie Tabby Point, Blue Silver Tortie Tabby Point, Chocolate Silver Tortie Tabby Pt, Lilac Silver Tortie Tabby Point, Caramel Silver Tortie Tabby Pt.

Smoke Point Birman -**Description**

Seal Smoke Point, Blue Smoke Point, Chocolate Smoke Point, Lilac Smoke Point, Red Smoke Point, Cream Smoke Points, Caramel Smoke Point, Apricot Smoke Point, Seal Tortie Smoke Point, Blue Tortie Smoke Point, Chocolate Tortie Smoke Point, Lilac Tortie Smoke Point, Caramel Tortie Smoke Point

EXOTIC SHORTHAIR**MAINE COON****NORWEGIAN FOREST CAT**

Colour descriptions for

Amber, Light Amber, Amber Tabby, Light Amber Tabby

PERSIAN

Many of the following colours have alternative colour titles. Refer to standards for details.

Persian - General

Self-ColoursBlack
White – Blue-Eyed;
Orange Eyed; Odd-EyedBlue
Chocolate
Lilac
Red
Cream
Caramel
Apricot**Tipped**Black Golden Shell – Green Eyed
Golden Shell – other colours
Black Chinchilla – Green-Eyed
Black Tipped Pewter – Orange Eyed
Blue Chinchilla – Green-Eyed
Blue Tipped Pewter – Orange-Eyed
Chocolate Chinchilla – Green-Eyed
Chocolate Tipped Pewter – Orange-Eyed
Lilac Chinchilla – Green-Eyed
Lilac Tipped Pewter – Orange-EyedRed Shell Cameo
Cream Shell Cameo
Caramel, Apricot Tipped
Black Tortie Tipped
Blue Tortie Tipped
Chocolate Tortie Tipped
Lilac Tortie Tipped
Caramel Tortie Tipped**Shaded**Black Golden Shaded – Green-Eyed
Golden Shaded – other colours
Black Shaded Silver – Green-Eyed
Black Shaded Pewter – Orange-Eyed
Blue Shaded Silver – Green-Eyed
Blue Shaded Pewter – Orange-Eyed
Chocolate Shaded Silver – Green-Eyed
Chocolate Shaded Pewter – Orange-Eyed
Lilac Shaded Silver – Green-Eyed
Lilac Shaded Pewter – Orange-EyedRed Shaded Cameo
Cream Shaded Cameo
Caramel, Apricot Shaded
Black Tortie Shaded
Blue Tortie Shaded
Chocolate Tortie Shaded
Lilac Tortie Shaded
Caramel Tortie Shaded**Smoke**Black Smoke
Blue Smoke
Chocolate Smoke
Lilac Smoke
Red Smoke
Cream Smoke
Caramel Smoke
Apricot Smoke
Black Tortie Smoke
Blue Tortie Smoke
Chocolate Tortie Smoke
Lilac Tortie Smoke**Tabby – Description of Tabby Patterns**Black Silver Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Blue Silver Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Chocolate Silver Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Lilac Silver Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Red Silver Tabby
Cream Silver Tabby
Caramel Silver Tabby
Apricot Silver Tabby
Black Silver Tortie Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Blue Silver Tortie Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Chocolate Silver Tortie Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Lilac Silver Tortie Tabby – Green-Eyed; Orange-Eyed
Black Golden Tabby – Green-Eyed
Golden Tabby – Other colours
Black (Brown) Tabby – Orange-EyedBlue Tabby
Chocolate Tabby
Lilac Tabby
Red Tabby
Cream Tabby
Caramel Tabby
Apricot Tabby
Black Tortie Tabby
Blue Tortie Tabby
Chocolate Tortie Tabby
Lilac Tortie Tabby
Tortoiseshell Pattern
Black Tortie
Blue Tortie (Blue Cream)
Chocolate Tortie
Lilac Tortie

Patched Cats With White
Bi-Colours, Tortie & Whites,
Vans
Bi-Colour & Van **Description**
Pointed Bi-colours

Colourpoint Persians – Description

Seal Point
 Blue Point
 Chocolate Point
 Lilac Point
 Red Point
 Cream Point
 Caramel Point
 Apricot Point

Tortie Points

Seal Tortie Point
 Blue Tortie Point
 Chocolate Tortie Point
 Lilac Tortie Point
 Caramel Tortie Point

Tabby Points – Description

Seal Tabby Point
 Blue Tabby Point
 Chocolate Tabby Point
 Lilac Tabby Point
 Red Tabby Point
 Cream Tabby Point
 Caramel Tabby Point
 Apricot Tabby Point

Tortie Tabby Points

Seal Tortie Tabby Point
 Blue Tortie Tabby Point
 Chocolate Tortie Tabby Point
 Lilac Tortie Tabby Point
 Caramel Tortie Tabby Point

Smoke Points – Description

Seal Smoke Point
 Blue Smoke Point
 Chocolate Smoke Point
 Lilac Smoke Point
 Red Smoke Point
 Cream Smoke Point
 Caramel Smoke Point
 Apricot Smoke Point

Tortie Smoke Points

Seal Tortie Smoke Point
 Blue Tortie Smoke Point
 Chocolate Tortie Smoke Point
 Lilac Tortie Smoke Point
 Caramel Tortie Smoke Point

Silver Tabby Points – Notes

Seal Silver Tabby Point
 Blue Silver Tabby Point
 Chocolate Silver Tabby Point
 Lilac Silver Tabby Point
 Red Silver Tabby Point
 Cream Tabby Point
 Caramel Silver Tabby Point
 Apricot Silver Tabby Point

Tortie Silver Tabby Points

Seal Silver Tortie Tabby Point
 Blue Silver Tortie Tabby Point
 Chocolate Tortie Tabby Point
 Lilac Silver Tortie Tabby Point
 Caramel Silver Tortie Tabby

Point

RAGDOLL

Ragdoll Pattern descriptions

Colourpoint, Mitted, Bi-colour

Seal Point
 Blue Point
 Chocolate Point
 Lilac Point
 Red Point
 Cream Point
 Caramel Point
 Apricot Point

Tortie Points

Seal Tortie Point
 Blue Tortie Point
 Chocolate Tortie Point
 Lilac Tortie Point
 Caramel Tortie Point

Tabby Points – Description

Seal Tabby Point
 Blue Tabby Point
 Chocolate Tabby Point
 Lilac Tabby Point
 Red Tabby Point
 Cream Tabby Point
 Caramel Tabby Point
 Apricot Tabby Point

Tortie Tabby Points

Seal Tortie Tabby Point
 Blue Tortie Tabby Point
 Chocolate Tortie Tabby Point
 Lilac Tortie Tabby Point
 Caramel Tortie Tabby Point

Smoke Points – Description

Seal Smoke Point
 Blue Smoke Point
 Chocolate Smoke Point
 Lilac Smoke Point
 Red Smoke Point
 Cream Smoke Point
 Caramel Smoke Point
 Apricot Smoke Point
 Seal Tortie Smoke Point
 Blue Tortie Smoke Point
 Chocolate Tortie Smoke Point
 Lilac Tortie Smoke Point
 Caramel Tortie Smoke Point

Silver Tabby Points – Description

Seal Silver Tabby Point
 Blue Silver Tabby Point
 Chocolate Silver Tabby Point
 Lilac Silver Tabby Point
 Red Silver Tabby Point
 Cream Tabby Point
 Caramel Silver Tabby Point
 Apricot Silver Tabby Point

Tortie Silver Tabby Points

Seal Silver Tortie Tabby Point
 Blue Silver Tortie Tabby Point
 Chocolate Tortie Tabby Point
 Lilac Silver Tortie Tabby Point
 Caramel Silver Tortie Tabby

Point

SIBERIAN

TURKISH VAN

Recognised Colours (with white)

Black, Blue, Red (Auburn),
 Cream,
 Black Tortie, Blue Tortie, Black
 Tabby, Blue Tabby, Red Tabby,
 Cream Tabby, Black Tortie
 Tabby, Blue Tortie Tabby

BREEDS, COLOURS & PATTERNS – GROUP 2

BALINESE

FOREIGN WHITE

(Shorthair & Longhair)

ORIENTAL LONGHAIR (Javanese)

ORIENTAL SHORTHAIR

Descriptions:

Non-Agouti / Self Colours
Agouti / Tabby Patterns

Black (Ebony)
Blue
Chocolate (Havana)
Lilac (Lavender)
Red
Cream
Cinnamon
Fawn
Caramel
Apricot
Tipped
Golden Tipped
Shaded
Golden Shaded
Smoke - Description
Black Smoke
Blue Smoke
Chocolate Smoke
Lilac Smoke
Red Smoke
Cream Smoke
Cinnamon Smoke
Fawn Smoke
Caramel Smoke
Apricot Smoke
Black Tortie Smoke
Blue Tortie Smoke
Chocolate Tortie Smoke
Lilac Tortie Smoke
Cinnamon Tortie Smoke
Fawn Tortie Smoke
Caramel Tortie Smoke
Tabby
Black Silver Tabby
Blue Silver Tabby
Chocolate Silver Tabby
Lilac Silver Tabby
Red Silver Tabby
Cream Silver Tabby
Cinnamon Silver Tabby
Fawn Silver Tabby
Caramel Silver Tabby
Apricot Silver Tabby
Black Silver Tortie Tabby
Blue Silver Tortie Tabby
Chocolate Silver Tortie Tabby
Lilac Silver Tortie Tabby
Cinnamon Silver Tortie Tabby
Fawn Silver Tortie Tabby

Caramel Silver Tortie Tabby
Golden Tabby
Black Tabby
Blue Tabby
Chocolate Tabby
Lilac Tabby
Red Tabby
Cream Tabby
Cinnamon Tabby
Fawn Tabby
Caramel Tabby
Apricot Tabby
Black Tortie Tabby
Blue Tortie Tabby
Chocolate Tortie Tabby
Lilac Tortie Tabby
Cinnamon Tortie Tabby
Fawn Tortie Tabby
Caramel Tortie Tabby
Tortoiseshell Pattern
Black Tortie
Blue Tortie
Chocolate Tortie
Lilac Tortie
Cinnamon Tortie
Fawn Tortie
Caramel Tortie
Patched Cats with White
Bi-colour
Tortie & White
Van

PETERBALD

SIAMESE

General Standard for Siamese
Seal Point
Blue Point
Chocolate Point
Lilac Point
Red Point
Cream Point
Cinnamon Point
Fawn Point
Caramel Point
Apricot Point
Seal Tortie Point
Blue Tortie Point
Chocolate Tortie Point
Lilac Tortie Point
Cinnamon Tortie Point
Fawn Tortie Point
Caramel Tortie Point
Tabby Point -General
Description
Seal Tabby Point
Blue Tabby Point
Chocolate Tabby Point
Lilac Tabby Point
Red Tabby Point
Cream Tabby Point
Cinnamon Tabby Point

Fawn Tabby Point
Caramel Tabby Point
Apricot Tabby Point
Tortie Tabby Point
Seal Tortie Tabby Point
Blue Tortie Tabby Point
Chocolate Tortie Tabby Point
Lilac Tortie Tabby Point
Cinnamon Tortie Tabby Point
Fawn Tortie Tabby Point
Caramel Tortie Tabby Point
Smoke Point
Seal Smoke Point
Blue Smoke Point
Chocolate Smoke Point
Lilac Smoke Point
Red Smoke Point
Cream Smoke Point
Cinnamon Smoke Point
Fawn Smoke Point
Caramel Smoke Point
Apricot Smoke Point
Seal Tortie Smoke Point
Blue Tortie Smoke Point
Chocolate Tortie Smoke Point
Lilac Tortie Smoke Point
Cinnamon Tortie Smoke Point
Fawn Tortie Smoke Point
Caramel Tortie Smoke Point
Silver Tabby Point - Notes
Seal Silver Tabby Point
Blue Silver Tabby Point
Chocolate Silver Tabby Point
Lilac Silver Tabby Point
Red Silver Tabby Point
Cream Silver Tabby Point
Cinnamon Silver Tabby Point
Fawn Silver Tabby Point
Caramel Silver Tabby Point
Apricot Silver Tabby Point
Silver Tortie Tabby Point
Seal Silver Tortie Tabby Point
Blue Silver Tortie Tabby Point
Chocolate Silver
Tortie Tabby Point
Lilac Silver Tortie Tabby Point
Cinnamon Silver
Tortie Tabby Point
Fawn Silver Tortie Tabby
Point
Caramel Silver
Tortie Tabby Point
Bi-colours (Patched with
White)

BREEDS, COLOURS & PATTERNS – GROUP 3

ABYSSINIAN

Tawny (Ruddy)
Cinnamon
Blue
Fawn
Black Silver
Cinnamon Silver
Blue Silver
Fawn Silver

AMERICAN CURL

AMERICAN SHORTHAIK

White
Black
Blue
Red
Cream

Tortie

Black Tortie
Blue Tortie

Tabby Pattern (Classic. Mackerel)

Black Tabby
Blue Tabby
Red Tabby
Cream Tabby
Black Tortie Tabby
Blue Tortie Tabby

Silver Tabby

Black Silver Tabby
Blue Silver Tabby
Red Silver Tabby
Black Silver Tortie Tabby
Blue Silver Tortie Tabby

Smoke

Black Smoke
Blue Smoke
Red Smoke
Cream Smoke
Black Tortie Smoke
Red Tortie Smoke

Tipped

Black Tipped
Blue Tipped
Red Tipped
Cream Tipped
Black Tortie Tipped
Blue Tortie Tipped

Shaded

Black Shaded Silver
Blue Shaded
Red Shaded
Cream Shaded
Black Tortie Shaded
Blue Tortie Shaded
Bicolour (in above colours)
Van (in above colours)

AUSTRALIAN BOMBAY

AUSTRALIAN MIST – General

Patterns

Brown
Blue
Chocolate
Lilac
Caramel
Gold
Peach

BENGAL

Brown Tabby
Seal Tabby Point
Seal Sepia Tabby / Seal Mink
Tabby
Black Silver Tabby
Seal Silver Tabby Point
Seal Silver Sepia Tabby
Seal Silver Mink Tabby
Any other colour

BOMBAY

BRITISH SHORTHAIK

Many of the following colours have alternative colour titles. Refer to standards for details of accepted alternatives.

British Shorthair - General

Self Colours

White – Blue-Eyed; Orange-Eyed; Odd-Eyed
Black
Blue
Chocolate
Lilac
Red
Cream
Cinnamon
Fawn

Tipped

Golden Shell – Green-Eyed
Golden Shell/Tipped – other colours
Black Tipped – Green-Eyed
Black Tipped Pewter – Orange-Eyed
Blue Tipped – Green-Eyed
Blue Tipped Pewter – Orange-Eyed
Chocolate Tipped – Green-Eyed
Chocolate Tipped Pewter – Orange-Eyed

Lilac Tipped – Green-Eyed
Lilac Tipped Pewter – Orange-Eyed
Red Shell Cameo
Cream Shell Cameo
Cinnamon Tipped,
Fawn Tipped,
Cinnamon Tortie Tipped
Fawn Tortie Tipped

Black Tortie Tipped
Blue Tortie Tipped
Chocolate Tortie Tipped
Lilac Tortie Tipped

Shaded

Black Golden Shaded – Green-Eyed
Golden Shaded – other colours
Black Shaded – Green-Eyed
Black Shaded Pewter – Orange-Eyed
Blue Shaded – Green-Eyed
Blue Shaded Pewter – Orange-Eyed
Chocolate Shaded – Green-Eyed
Chocolate Shaded Pewter – Orange-Eyed
Lilac Shaded – Green-Eyed
Lilac Shaded Pewter – Orange-Eyed
Red Shaded Cameo

Cream Shaded Cameo
Cinnamon Shaded
Fawn Shaded
Black Tortie Shaded
Blue Tortie Shaded
Chocolate Tortie Shaded
Lilac Tortie Shaded
Cinnamon Tortie Shaded
Fawn Tortie Shaded

Smoke

Black Smoke
Blue Smoke
Chocolate Smoke
Lilac Smoke
Red Smoke
Cream Smoke
Cinnamon Smoke
Fawn Smoke
Black Tortie Smoke
Blue Tortie Smoke
Chocolate Tortie Smoke
Lilac Tortie Smoke
Cinnamon Tortie Smoke
Fawn Tortie Smoke

Tabby – Description of Tabby Patterns

Black Silver Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Blue Silver Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Choc. Silver Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Lilac Silver Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Red Silver Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Cream Silver Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Cinnamon Silver Tabby
Fawn Silver Tabby
Black Silver Tortie Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Blue Silver Tortie Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Chocolate Silver Tortie Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Lilac Silver Tortie Tabby
– Green-Eyed; Orange-Eyed
Cinnamon Silver Tortie Tabby
Fawn Silver Tortie Tabby
Golden Tabby – Black, Green-Eyed
Golden Tabby – other colours
Black (Brown) Tabby
– Orange-Eyed

Blue Tabby
Chocolate Tabby
Lilac Tabby
Red Tabby
Cream Tabby
Cinnamon Tabby
Fawn Tabby
Black Tortie Tabby
Blue Tortie Tabby
Chocolate Tortie Tabby
Lilac Tortie Tabby
Cinnamon Tortie Tabby
Fawn Tortie Tabby

Tortoiseshell Pattern

Black Tortie
Blue Tortie (Blue Cream)

Chocolate Tortie
 Lilac Tortie
 Cinnamon Tortie
 Fawn Tortie
Patched Cats with White
 Bi-Colours
 Tortie & Whites
 Vans
 Bi-Colour & Van Descriptions
 Pointed Bi-colours
Colourpoint—Description
 Seal Point
 Chocolate Point
 Red Point
 Cinnamon Point
 Caramel Point
 Tortie Points
 Seal Tortie Point
 Chocolate Tortie Point
 Lilac Tortie Point
 Fawn Tortie Point
Tabby Points – Description
 Seal Tabby Point
 Chocolate Tabby Point
 Red Tabby Point
 Cinnamon Tabby Point
 Caramel Tabby Point
 Tortie Tabby Point
 Seal Tortie Tabby Point
 Blue Tortie Tabby Point
 Chocolate Tortie Tabby Point
 Lilac Tortie Tabby Point
 Caramel Tortie Tabby Point
Smoke Points – Description
 Seal Smoke Point
 Blue Smoke Point
 Chocolate Smoke Point
 Lilac Smoke Point
 Red Smoke Point
 Cream Smoke Point
 Cinnamon Smoke Point
 Fawn Smoke Point
 Caramel Smoke Point
 Apricot Smoke Point
Tortie Smoke Points
 Seal Tortie Smoke Point
 Blue Tortie Smoke Point
 Chocolate Tortie Smoke Point
 Lilac Tortie Smoke Point
 Cinnamon Tortie Smoke Point
 Fawn Tortie Smoke Point
 Caramel Tortie Smoke Point
Silver Tabby Points – Notes
 Seal Silver Tabby Point
 Blue Silver Tabby Point
 Chocolate Silver Tabby Point
 Lilac Silver Tabby Point
 Red Silver Tabby Point
 Cream Tabby Point
 Cinnamon Silver Tabby Point
 Fawn Silver Tabby Point
 Caramel Silver Tabby Point
 Apricot Silver Tabby Point
 Tortie Silver Tabby Points
 Seal Silver Tortie Tabby Point
 Blue Silver Tortie Tabby Point
 Chocolate Tortie Tabby Point
 Lilac Silver Tortie Tabby Point
 Caramel Silver Tortie Tabby Point

BURMILLA
 (Shorthair and Longhair)
Group A Non-Orange
 Black (Seal) Silver Tipped / Shaded
 Blue Silver Tipped / Shaded
 Brown Silver Tipped / Shaded
 Chocolate Silver Tipped / Shaded
 Lilac Silver Tipped / Shaded
 Caramel Silver Tipped / Shaded
Group B Orange
 Red Silver Tipped / Shaded
 Cream Silver Tipped / Shaded
 Apricot Silver Tipped / Shaded
 Black Tortie Silver Tipped / Shaded
 Brown Tortie Silver Tipped / Shaded
 Blue Tortie Silver Tipped / Shaded
 Chocolate Tortie Silver Tipped / Shaded
 Lilac Tortie Silver Tipped / Shaded
 Caramel Tortie Silver Tipped / Shaded

CORNISH REX

CYMRIC (Longhaired Manx)
 Stumpy & Rumpy

DEVON REX

EGYPTIAN MAU

JAPANESE BOBTAIL
 White
 Black
 Red
 Black and White
 Mi-Ke
 Tortoiseshell
 Other Japanese Bobtail Colours

KORAT

LAPERMI
 (Shorthair & Longhair)

MANX Rumpy
 Manx Stumpy

OCICAT
 Tawny (Brown Spotted Tabby)
 Blue
 Chocolate
 Lavender
 Cinnamon
 Fawn
 Black Silver
 Blue Silver
 Chocolate Silver
 Lavender Silver
 Cinnamon Silver
 Fawn Silver

PIXIEBOB

RUSSIAN
 Blue
 White
 Black

SCOTTISH FOLD
 Scottish Fold Longhair
 Scottish Longhair
 Scottish Shorthair

SELKIRK REX

SINGAPURA

SOMALI

SPHYNX

TONKINESE
 Seal (Natural) Mink
 Blue Mink
 Chocolate (Champagne) Mink
 Lilac (Platinum) Mink
 Red Mink
 Cream Mink
 Cinnamon Mink
 Fawn Mink
 Caramel Mink
 Apricot Mink

Tortie—General Description

Seal Tortie Mink
 Blue Tortie Mink
 Chocolate Tortie Mink
 Lilac Tortie Mink
 Cinnamon Tortie Mink
 Fawn Tortie Mink
 Caramel Tortie Mink

Solid Tonkinese

Seal, Blue, Chocolate, Lilac, Red, Cream, Cinnamon, Fawn, Caramel, Apricot, Seal Tortie, Blue Tortie, Chocolate Tortie, Lilac Tortie, Cinnamon Tortie, Fawn Tortie, Caramel Tortie

Pointed Tonkinese

Seal Point, Blue Point, Chocolate Point, Lilac Point, Red Point, Cream Point, Cinnamon Point, Caramel Point, Apricot Point, Seal Tortie Point, Blue Tortie Point, Chocolate Tortie Point, Lilac Tortie Point, Cinnamon Tortie Point, Fawn Tortie Point, Caramel Tortie Point

CHARTREAU

EUROPEAN SHORTHAI

GERMAN REX

Note: there are no exhibits of these breeds in Australia so no current standard is included.

Annexe 2 : Standards des robes caramel et abricot pour le SACCExtrait de <http://www.tsacc.org.za/downloads/General%20-%20colour%20-%202010.pdf>

Caramel <i>Colour code: 11</i> Brownish pinkish grey, even and solid to the roots. Faults: White hairs.	Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell <i>Colour code: 21</i> Brownish pinkish grey patched or mingled at random with apricot.	Bluish fawn and / or pink
Caramel Shaded <i>Colour & Shaded Code: 11 Sh</i> Undercoat white, evenly shaded with caramel, giving an overall effect of a caramel mantle. Legs shaded with caramel. Chin, ear tufts and under parts white. Tabby markings, cream or brown tinges a fault. Pad tufts uniform for all four paws and may be caramel or white.	Nose leather: Pink outlined in bluish fawn or bluish fawn Lips, eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Cameo <i>Colour and Shaded Code: 21 Ca</i> Undercoat as white as possible. Tipping caramel patched or mingled at random with apricot. Any large areas of apricot may show ghost barring. Presence or absence of a blaze immaterial. Solid colour on legs and feet undesirable. Intensity of tipping immaterial. Ear tufts, ruff, flanks and under parts to be white.	Nose leather & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Smoke <i>Colour & Shaded Code: 11 Sm</i> Undercoat pale silver. Tips shading to caramel on head, ears, back, feet and tail. Ruff, ear tufts, sides, flanks and under parts pale silver.	Nose leather & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Smoke <i>Colour & Shaded Code: 21 Sm</i> Undercoat pale silver. Tips shading to caramel patched or mingled at random with apricot on head, ears, back, feet and tail. Ruff, ear tufts, sides, flanks and under parts pale silver.	Nose leather & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Tabby <i>Colour & Pattern Code: Classic 11 Tc</i> <i>Mackerel 11 Tm</i> <i>Spotted 11 Ts</i> <i>Marble 11 Tr</i> Agouti ground colour, ear tufts, lips and chin cool toned beige. Markings brownish pinkish grey. No warm tones in ground colour. Contrast between ground colour and markings may be less apparent.	Nose leather: Pinkish grey or pink, outlined in brownish grey Lips, eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Tabby <i>Colour & Pattern Code: Classic 21 Tc</i> <i>Mackerel 21 Tm</i> <i>Spotted 21 Ts</i> <i>Marble 21 Tr</i> Agouti ground colour and ear tufts, lips and chin cool toned beige. Markings brownish pinkish grey. Both ground colour and markings patched or mingled at random with varying shades of apricot. Contrast between ground colour and markings may be less apparent.	Nose leather: Pinkish grey or pink, outlined in brownish grey or brownish grey and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Silver Tabby <i>Colour & Pattern Code: Classic 11 ShTc</i> <i>Mackerel 11 ShTm</i> <i>Spotted 11 ShTs</i>	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey

<i>Marble 11 ShTr</i> Agouti ground colour and ear tufts, lips and chin pale silvery beige. Markings brownish pinkish grey and clearly defined. Not solid to the roots. Allow for light chin, and bluish fawn nose leather in kittens and young adults.	Lips, eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Silver Tabby <i>Colour & Pattern Code: Classic 21 ShTc</i> <i>Mackerel 21 ShTm</i> <i>Spotted 21 ShTs</i> <i>Marble 21 ShTr</i> Agouti ground colour, lips and chin silvery beige with brownish pinkish grey markings. Not solid to the roots. Both ground colour and pattern may be patched or mingled at random with varying shades of apricot.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey or brownish grey and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Ticked Tabby <i>Colour & Pattern Code: Ticked 11 Tt</i> Ground colour beige. Ticking and markings brownish pinkish grey with a metallic sheen. Back of hind legs brownish pinkish with a metallic sheen from paw to hock.	Nose leather: Pinkish grey or pink, outlined in brownish grey or brownish grey Lips, eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Ticked Tabby <i>Colour & Pattern Code: Ticked 21 Tt</i> Ground colour beige. Ticking and markings brownish pinkish grey with a metallic sheen. Back of hind legs brownish pinkish grey with a metallic sheen from paw to hock. The coat may be patched or mingled at random with varying shades of apricot.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey or brownish grey, and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Silver Ticked Tabby <i>Colour & Pattern Code: Ticked 11 ShTt</i> Ground colour pale silvery beige. Ticking and markings brownish pinkish grey with a metallic sheen. Back of hindlegs brownish pinkish grey with a metallic sheen from paw to hock.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey or brownish grey Lips, eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Silver Ticked Tabby <i>Colour & Pattern Code: Ticked 21 ShTt</i> Ground colour pale silvery beige. Ticking and markings brownish pinkish grey with a metallic sheen. Back of hind legs brownish pinkish grey with a metallic sheen from paw to hock. The coat may be patched or mingled at random with varying shades of apricot.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey or brownish grey, and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Point <i>Colour & Pointed Code: 11 Pt</i> Body: Off-white (magnolia). Shading if any to tone with the points. Points: Brownish grey. Legs and feet may be paler in tone.	Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Point <i>Colour & Pointed Code: 21 Pt</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; tortoiseshell shading if any to tone with points. Points: Brownish grey, patched or mingled at random with apricot, varying shades permitted. Any large areas of apricot may show some barring.	Bluish fawn and / or pink
Caramel Tabby Point <i>Colour & Pointed Code: 11 Tp</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; tabby shading, if any, to tone with points. Points: Clear brownish grey tabby markings.	Nose leather: Bluish fawn or pink outlined in bluish fawn Eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Tabby Point	Nose leather:

<i>Colour & Pointed Code: 21 Tp</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; tabby shading and tortoiseshell patching, if any, to tone with points. Points: Clear brownish grey tabby markings, patched or mingled at random with apricot, varying shades permitted. Distribution of patching immaterial. Ears mottled.	Pinkish grey or pink outlined in brownish grey and / or pink Eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Silver Tabby Point <i>Colour & Pointed Code: 11 ShTp</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; tabby shading, if any, to tone with points. Points: Clear brownish grey tabby markings on silver ground ticked with brownish grey. Markings will not be solid to the roots.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey Eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Silver Tortoiseshell Tabby Point <i>Colour & Pointed Code: 21 ShTp</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; tabby shading and tortoiseshell patching, if any, to tone with points. Points: Clear brownish grey tabby markings on silver ground ticked with brownish grey, patched or mingled at random with apricot, varying shades permitted. Distribution of patching immaterial. Markings will not be solid to the roots. Ears mottled.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey and / or pink Eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Smoke Point <i>Colour & Pointed Code: 11 SmPt</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; shading, if any, to tone with points. Points: Clear brownish grey with pale silver roots.	Nose leather, eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Smoke Point <i>Colour & Pointed Code: 21 SmPt</i> Body: Off-white (magnolia), as clear as possible; shading, if any, to tone with points. Points: Clear brownish grey, patched or mingled at random with apricot, varying shades permitted, with pale silver roots. Any large areas of apricot may show some barring. Ears mottled.	Nose leather, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Bi-Colour 11 Bi</i> <i>Harlequin 11 Ha</i> <i>Van 11 Va</i> Caramel patched with white.	Bluish fawn and / or pink
Caramel Tabby Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Tabby Bi-Colour 11 *Bi</i> <i>Tabby Harlequin 11 TbHa</i> <i>Tabby Van 11 TbVa</i> Caramel tabby patched with white.	Nose leather: Pink outlined in bluish fawn or bluish fawn and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Silver Tabby Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Tabby Bi-Colour 11 Sh*Bi</i> <i>Tabby Harlequin 11 ShTbHa</i> <i>Tabby Van 11 ShTbVa</i> Caramel silver tabby patched with white	Nose leather: Pink outlined in bluish fawn or bluish fawn and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Shaded Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Shaded Bi-Colour 11 ShBi</i> <i>Shaded Harlequin 11 ShHa</i> <i>Shaded Van 11 ShVa</i> Caramel shaded patched with white.	Nose leather: Pink outlined in bluish fawn or bluish fawn and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Smoke Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Smoke Bi-Colour 11 SmBi</i> <i>Smoke Harlequin 11 SmHa</i>	Nose leather & pads: Bluish fawn and / or pink

Smoke Van 11 SmVa Caramel smoke patched with white.	
Caramel Calico <i>Colour & Patched Code: Bi-Colour 21 Bi</i> <i>Harlequin 21 Ha</i> <i>Van 21 Va</i> Caramel patched or mingled at random with apricot, and white	Bluish fawn and / or pink
Caramel Calico Tabby <i>Colour & Patched Code: Calico Tabby 21 *Bi</i> <i>Tabby Harlequin 21 TbHa</i> <i>Tabby Van 21 TbVa</i> Caramel tortoiseshell tabby patched with white.	Nose leather: Pink outlined in bluish fawn or bluish fawn and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Silver Calico Tabby <i>Colour & Patched Code: Calico Tabby 21 Sh*Bi</i> <i>Tabby Harlequin 21 ShTbHa</i> <i>Tabby Van 21 ShTbVa</i> Caramel silver tortoiseshell tabby patched with white.	Nose leather: Pink outlined in bluish fawn or bluish fawn and / or pink Lips, eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Cameo Calico <i>Colour & Patched Code: Cameo Calico 21 CaBi</i> <i>Cameo Harlequin 21 CaHa</i> <i>Cameo Van 21 CaVa</i> Caramel tortoiseshell cameo patched with white	Nose leather & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Smoke Calico <i>Colour & Patched Code: Smoke Calico 21 SmBi</i> <i>Smoke Harlequin 21 SmHa</i> <i>Smoke Van 21 SmVa</i> Caramel tortoiseshell smoke patched with white.	Nose leather & pads: Bluish fawn and / or pink
Caramel Mink <i>Colour & Mink Code: 11 Mp</i> Body & Points: Any shade of brownish pinkish grey body colour merging with darker brownish pinkish grey points, with a metallic sheen that is most noticeable with maturity.	Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Mink <i>Colour & Mink Code: 21 Mp</i> Body & Points: Any shade of Brownish pinkish grey well broken with varying shades of apricot with a metallic sheen that is most noticeable with maturity. The colours will be slightly darker on the points.	Bluish fawn and / or pink
Caramel Tabby Mink <i>Colour & Mink Code: 11 MpTb</i> Body & Points: Any shade of brownish pinkish grey markings against a beige agouti background, with darker tabby markings on the points. The markings should show a metallic sheen that is more noticeable with maturity	Nose leather: Pinkish grey or pink, outlined in brownish grey Eye rims & pads: Bluish fawn
Caramel Tortoiseshell Tabby Mink <i>Colour & Mink Code: 21 MpTb</i> Body & Points: Any shade of brownish pinkish grey tabby markings against a beige agouti background broken and overlaid with varying shades of apricot. The colours will be slightly darker on the points. The markings should show a metallic sheen that is more noticeable with maturity. Both elements of tortie and tabby must be present but the distribution of colour is immaterial.	Nose leather: Pinkish grey or pink outlined in brownish grey and / or pink Eye rims & pads: Bluish fawn and / or pink
Apricot <i>Colour code: 14</i> Hot sandy cream with a soft metallic sheen, which becomes more	Pink

noticeable with maturity. Even and solid to the roots and as free from tabby markings as possible. Allowances: Freckles may appear on the nose leather, lips, eyelids, ears, and paws. Slight freckling in adults and ghost tabby markings permissible. Faults: Excessive tabby markings in coat.	
Apricot Shaded (Apricot Cameo) <i>Colour and Shaded Code: 14 Ca</i> Undercoat as white as possible. Tipping apricot. Solid colour on legs and feet undesirable. Intensity of tipping immaterial. Ear tufts, ruff, flanks and under parts to be white.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Smoke <i>Colour & Shaded Code: 14 Sm</i> Undercoat as white as possible. Tips shading to apricot on head, ears, back, feet and tail. Ruff, ear tufts, sides, flanks and under parts white.	Nose leather & pads: Pink
Apricot Tabby <i>Colour & Pattern Code: Classic 14 Tc</i> <i>Mackerel 14 Tm</i> <i>Spotted 14 Ts</i> <i>Marble 14 Tr</i> Agouti ground colour and ear tufts, lips and chin pale cream. Markings hot sandy cream with a soft metallic sheen.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Silver Tabby (Apricot Cameo Tabby) <i>Colour & Pattern Code: Classic 14 ShTc</i> <i>Mackerel 14 ShTm</i> <i>Spotted 14 ShTs</i> <i>Marble 14 ShTr</i> Agouti ground colour and ear tufts, lips and chin pale silvery near white (as white as possible). Markings apricot and clearly defined. Not solid to the roots. Allow for light chin.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Ticked Tabby <i>Colour & Pattern Code: Ticked 14 Tt</i> Ground colour pale cream. Ticking and markings hot sandy cream with a soft metallic sheen. Back of hind legs cream from paw to hock. Contrast between ground colour and ticking may be less apparent.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Silver Ticked Tabby <i>Colour & Pattern Code: Ticked 14 ShTt</i> Ground colour pale silvery near white (as white as possible). Ticking and markings hot sandy cream with a soft metallic sheen. Back of hind cream from paw to hock. Contrast between ground colour and ticking may be less apparent.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Point <i>Colour & Pointed Code: 14 Pt</i> Body: Off-white. Shading if any to tone with the points. Points: Hot cream with a soft metallic sheen. The legs and feet may be slightly paler than the other points. Barring on mask, legs and tail is permissible. Freckles may appear on nose, lips, eyelids, ears and pads. Slight freckling in a mature adult should not be penalised.	Pink
Apricot Tabby Point <i>Colour & Pointed Code: 14 Tp</i> Body: Off-white, as clear as possible; tabby shading, if any, to tone with points. Points: Clear hot cream with a soft metallic sheen tabby markings. Thumbprints may be less apparent.	Nose leather, eye rims & pads: Pink
Apricot Silver Tabby Point <i>Colour & Pointed Code: 14 ShTp</i>	Nose leather, eye rims & pads:

Body: Off-white, as clear as possible; tabby shading, if any, to tone with points. Points: Clear hot cream with a soft metallic sheen tabby markings on silver ground ticked with hot cream. Markings will not be solid to the roots. Thumbprints may be less apparent.	Pink
Apricot Smoke Point <i>Colour & Pointed Code: 14 SmPt</i> Body: Off-white, as clear as possible; shading, if any, to tone with points. Points: Clear hot cream with a soft metallic sheen with pale silver (near white) roots.	Nose leather, eye rims & pads: Pink
Apricot Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Bi-Colour 14 Bi Harlequin 14 Ha Van 14 Va</i> Apricot patched with white. Any large areas of apricot may show some barring.	Pink
Apricot Tabby Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Tabby Bi-Colour 14 *Ha Tabby Harlequin 14 TbHa Tabby Van 14 TbVa</i> Apricot tabby patched with white.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Silver Tabby Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Tabby Bi-Colour 14 Sh*Ha Tabby Harlequin 14 ShTbHa Tabby Van 14 ShTbVa</i> Apricot silver tabby patched with white.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Shaded Bi-colour [Apricot Cameo] <i>Colour & Patched Code: Cameo Bi-Colour 14 CaBi Cameo Harlequin 14 CaHa Cameo Van 14 CaVa</i> Apricot shaded patched with white.	Nose leather, lips, eye rims & pads: Pink
Apricot Smoke Bi-colour <i>Colour & Patched Code: Smoke Bi-Colour 14 SmBi Smoke Harlequin 14 SmHa Smoke Van 14 SmVa</i> Apricot smoke patched with white	Nose leather & pads: Pink
Apricot Mink <i>Colour & Mink Code: 14 Mp</i> Body & Points: Hot cream body merging with darker hot cream points showing a fawn undertone, with a metallic sheen that is most noticeable with maturity. Barring on mask, legs and tail is permissible. Note: Freckles may appear on nose leather, lips, eye rims, ears and paw pads and should not be penalised.	Pink
Apricot Tabby Mink <i>Colour & Mink Code: 14 MpTb</i> Body & Points: Hot cream body markings against a pale cream agouti background, with darker tabby markings on the points. The coat should show a cool metallic sheen that is more noticeable with maturity. Note: . Freckles may appear on nose leather, eye rims, lips, paw pads and ears and should not be penalised.	Nose leather, eye rims & pads: Pink

SIAMOIS

CARAMEL POINT (24n) (Provisional status)

Eyes: Brilliant intense blue, the deeper the better.

Points: Dark brownish blue (in blue based), brownish grey (in lilac/fawn based), matching on all points although the legs may be slightly paler in tone than the other points.

Body: Off white. Shading, if any, to tone with the points.

Nose Leather, Eye Rims & Paw Pads: Pinkish grey.

Withhold Certificates or First Prizes in Kitten Open Classes for:

1. Pale and/or dull eye colour.
2. Points not matching in colour.
3. General Siamese withholding faults.

APRICOT POINT (32fn) (Provisional status)

Eyes: Brilliant intense blue, the deeper the better.

Points: Mask, ears and tail, apricot, hot in tone with a slightly darker dusting that develops and becomes more noticeable with maturity. The legs and feet will be slightly paler in colour but definite colour should show at the rear of the hind legs below the hock. Barring and striping on the mask, legs and tail is permissible. Mature cats may show a pewter sheen on the ghost tabby markings, particularly on the head, but also under the feet. "Freckles" may occur on nose, lips, eyelids and ears. Slight freckling in a mature cat should not be penalised.

Body: Warm creamy white. Shading, if any to tone with the points. Such shading may be uneven and an Apricot Point should be penalised for shading no more nor less severely than a Blue Point.

Nose Leather, Eye Rims & Paw Pads: Pink.

CARAMEL TABBY POINT (32 8)

Points: Clear dark brownish blue (in blue based) or brownish grey (in lilac/fawn based) tabby markings. Nose leather pinkish grey or pink rimmed with pinkish grey. Eye rims pinkish grey. Paw pads pinkish grey or pink.

Body: Off-white. Tabby shading, if any, to tone with the points.

APRICOT TABBY POINT (32 10)

Points: Clear hot cream tabby markings with a soft metallic sheen which becomes more noticeable with maturity. Nose leather, eye rims and paw pads pink. "Freckles" may occur on nose, pads, lips, eyelids and ears. Slight freckling in a mature cat should not be penalised.

Body: Warm creamy white. Tabby shading, if any, to tone with the points.

CARAMEL TORTIE POINT (32b8)

Points: Dark brownish blue (in blue based) or brownish grey (in lilac/fawn based) with shades of apricot.

Body: Off-white. Shading, if any, to tone with the points.

CARAMEL TORTIE TABBY POINT (32t8)

Points: Clear dark brownish blue (in blue based) or brownish grey (in lilac/fawn based) tabby markings patched and/or mingled at random with shades of apricot. The ears may be mottled. The distribution and degree of apricot patching is immaterial. Nose leather, eye rims and paw pads pinkish grey and/or pink.

Body: Off-white. Tabby shading and tortie patching, if any, to tone with the points.

BALINAIS

APRICOT POINT (61fn)

Points: Mask, ears and tail apricot, hot in tone with a slightly darker dusting that develops and becomes more noticeable with maturity. The legs and feet will be slightly paler in colour but definite colour should show at the rear of the hind legs below the hock. Barring and striping on mask, legs and tail is permissible. Mature cats may show a pewter sheen on the ghost tabby markings, particularly on the head, but also under the feet. 'Freckles' may occur on nose, paw pads, lips, eyelids and ears. Slight freckling in a mature cat should not be penalised.

Body: Warm creamy white. Shading, if any, to tone with the points. Such shading may be uneven and an Apricot Point should be penalised for shading no more nor less severely than a Blue Point.

Nose Leather & Paw Pads: Pink.

Withhold certificates or first prizes in Kitten Open Classes for:

1. Cool toned cream in points or body colour.

CARAMEL POINT (61n)

Points: Dark brownish blue (in blue based) or brownish grey (in lilac based), matching on all points although the legs may be slightly paler in tone than the other points.

Body: Off-white. Shading, if any, to be the same tone as the points.

Nose Leather, Eye Rims & Paw Pads: Brownish purple (in blue based) or pinkish grey (in lilac based).

Withhold certificates or first prizes in Kitten Open Classes for:

1. Points not matching in colour.

CARAMEL TORTIE POINT (61p)

Points: Dark brownish blue (in blue based) or brownish grey (in lilac based) with shades of apricot.

Body: Off-white. Shading, if any, to tone with points.

Nose Leather & Paw Pads: Brownish purple (in blue based) or pinkish grey (in lilac based) and/or pink.

TABBY POINT (61t, 61at, 61bt, 61ct, 61dt, 61ft, 61fnt, 61nt)

(Note: The standard for Tortie Tabby Points is given after the Tabby Point standard.)

Points: The mask, legs and tail should all show clear tabby markings which should be the same colour on all points, although leg markings may be slightly paler in tone. Paler markings are acceptable in kittens.

Mask: Clearly defined stripes, especially around the eyes and nose, with a clearly defined 'M' marking on the forehead and distinct stripes ('ribbons') on the cheeks and darkly spotted whisker pads. The stripes should not extend over the top of the head to form a 'hood'.

Ears: The edges of the ears should be the same colour as the markings on the mask with a central patch of paler colour resembling a thumb print. These thumb prints may be less apparent in dilute colours.

Body: Pale, showing clear contrast with the points as in the equivalent solid-pointed Balinese. Any shading on the body should tone with the points, and will show the underlying tabby pattern which may be ticked, spotted, mackerel or classic. A Tabby Point should be penalised for shading no more nor less severely than the equivalent solid-pointed Balinese. Any shading should tone with the points.

Legs: Clearly defined, varied sized, broken stripes. Solid markings on the back of hind legs. The leg markings may be slightly paler in tone than the other points, especially in Red, Cream or Apricot Tabby Points.

Tail: Varied-sized rings, possibly broken. The rings should extend for the entire length of the tail, ending in a solid tip except in Red, Cream and Apricot Tabby Points where the tip may be pale.

CARAMEL TORTIE TABBY POINT (61pt)

Points - In blue based: Tabby markings dark brownish blue with shades of apricot. Nose leather, eye rims & paw pads brownish purple and/or pink.

In lilac based: Tabby markings brownish grey with shades of apricot. Nose leather, eye rims & paw pads pinkish grey and/or pink.

Body: Off-white.



UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

ENVA, 7 Avenue du Général de Gaulle

F-94700

Maisons-Alfort

FRANCE

Tel : +33 1 43 96 70 01

Mail : m.abitbol@vet-alfort.fr

Maisons-Alfort, February 2011

Topic: Phenotypic and molecular characterization of the caramel and apricot coat colours in cats

The laboratory of Functional and Medical Genetics of l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (the French National Veterinary School in Alfort, near Paris) conducts a study on the genetic basis of the caramel and apricot coat colours in cats. The purpose of the study is to characterize the phenotype of caramel and apricot cats, identify the genetic origin of these colours due to a locus named "Dilute modifier" and to explore the molecular basis of the dilute modifier locus in cats. In order to do this, we need DNA samples from caramel and apricot cats belonging to any breed and from their close relatives.

If you wish to participate in this study, we kindly ask you to send a DNA sample: 5 ml of blood on EDTA vials - or 2 cheek cell samples collected by use of cheek swabs, performed by yourself (we will naturally provide the swabs upon simple request) - accompanied by a copy of your cats pedigree and the signed consent form, to:

Dr Marie Abitbol
UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
7 Avenue du Général de Gaulle
F-94700 Maisons Alfort
FRANCE

Conditions of the study: this study is performed within the frame of a veterinary thesis by an ENVA student, at UMR955 INRA-ENVA of Functional and Medical Genetics.

Supervisor: Dr. Marie Abitbol, DVM, PhD, Associate Professor, UMR955 Functional and Medical Genetics.

Any nominative information sent to us will remain strictly confidential. All genetic information will be collected anonymously and will be the subject of an anonymous statistical analysis, in order to improve the genetic characterization of the caramel and apricot coat colours in cats.

No financial contribution is required to participate in this study. You will not receive any result concerning your cat, but we will send you a pdf copy of the thesis (in French) as soon as it will be achieved, on your e-mail request. Without your active help this genetic study will not be successful and we thank you in advance for your participation.

Dr. Marie Abitbol
m.abitbol@vet-alfort.fr
+33 1 43 96 70 01



Genetic study of the caramel and apricot coat colours in cats
An Alfort School of Veterinary Medicine research program

For each cat:

- Fill in the questionnaire
- Join a copy of the pedigree
- Join a blood sample (5ml blood in EDTA tube, kept and sent at room temperature, in a protected envelope as a simple letter or little package) - or 2 cheek cell samples (which can be performed by yourself and sent as a simple letter).

All veterinaries as well as all the members of the CAT project are engaged to keep a complete confidentiality on all received information.

In case of questions or doubts please feel free to contact Dr. Marie Abitbol on +33-1-43-96-70-01 or by email to: m.abitbol@vet-alfort.fr.

Cats Identity:

(ENVA's File number if the cat has already been examined at the ENVA: _____)

Name: _____ Birth date: _____

Sex: ☐ male ☐ female Identification Number: _____

Coat colour:

Your postal address:

Email address:

I accept the conditions of this study led by the ENVA on the genetic basis of the caramel and apricot coat colours and agree to the use of my cats DNA as described above (blood sample or cheek swabs) for genetic research.

Date

Signature

Please send the questionnaire together with the pedigree and the blood sample or cheek swabs to:

Dr Marie ABITBOL
UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
7 Avenue du Général de Gaulle
F-94700 Maisons-Alfort
FRANCE



Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit

All technical literature is available on the Internet at: www.promega.com/protocols
Please visit the web site to verify that you are using the most current version of this
Technical Manual. Please contact Promega Technical Services if you have questions on use
of this system. E-mail: techserv@promega.com

1. Description	1
2. Product Components and Storage Conditions	2
3. Before You Begin	3
A. Preparation of Whole Blood Samples	3
B. Preparation of Buccal Swab Samples	4
C. Maxwell® 16 Cartridge Preparation	5
4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments	6
5. Reference	9
6. Troubleshooting.....	9
7. Related Products	10

1. Description

The Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit are used with the Maxwell® 16 Instrument to provide an easy method for efficient, automated purification that concentrates genomic DNA (gDNA) from samples. The Maxwell® 16 Instrument is supplied with preprogrammed purification procedures and is designed for use with the predisposed reagent cartridges, maximizing simplicity and convenience. The instrument can process up to 16 samples in 40 minutes. The purified DNA can be used directly in a variety of downstream applications, including PCR and agarose gel electrophoresis.

The Maxwell® 16 Instrument purifies samples using a novel paramagnetic particle, called the MagnaCel™ particle, which provides a mobile solid phase that optimizes sample capture, washing and purification of gDNA. This particle utilizes cellulose-based binding of nucleic acids and provides a higher bind capacity and cleaner eluate than traditional silica-based DNA purification. The Maxwell® 16 Instrument is a magnetic particle-handling instrument that efficiently binds gDNA to the paramagnetic particle in the first well of a prefilled cartridge and mixes during processing. The approach to magnetic capture avoids common problems such as clogged tips or partial reagent transfers that result in suboptimal purification processing by other commonly used automated systems.

2. Product Components and Storage Conditions

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	48 preps	AS1290

For Laboratory Use. Sufficient for 48 automated isolations from 300µl of whole blood samples. Includes:

- 2 × 1ml Proteinase K (PK) Solution
- 20ml Lysis Buffer
- 48 Maxwell® 16 LEV Cartridges (MCD)
- 50 LEV Plungers
- 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 20ml Elution Buffer

Storage Conditions: Store the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit at 15–30°C.

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit	48 preps	AS1295

For Laboratory Use. Sufficient for 48 automated isolations from buccal swab samples. Includes:

- 2 × 1ml Proteinase K (PK) Solution
- 20ml Lysis Buffer
- 48 Maxwell® 16 LEV Cartridges (MCD)
- 50 LEV Plungers
- 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 20ml Elution Buffer
- 50 Clearing Columns

Storage Conditions: Store the Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit at 15–30°C.

Available Separately (recommended for sample extraction)

Product	Size	Cat.#
ClickFit Microtube, 1.5ml	1,000/pack	V4741

Safety Information: The reagent cartridges contain ethanol and isopropanol. These substances should be considered flammable, harmful and irritants.



The Maxwell® 16 reagent cartridges are designed to be used with potentially infectious substances. Users should wear appropriate protection (e.g., gloves and goggles) when handling infectious substances. Users should adhere to their institutional guidelines for the handling and disposal of all infectious substances when used with this system.

3. Before You Begin

Maxwell® 16 Instrument Hardware and Firmware Setup

To use the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit or Buccal Swab LEV DNA Purification Kit, the Maxwell® 16 Instrument must be configured with LEV hardware. If your Maxwell® 16 Instrument contains standard elution volume (SEV) hardware, it will need to be reconfigured using the Maxwell® 16 LEV Hardware Kit (Cat.# AS1250). Reconfiguring the instrument is simple and easy. Refer to the *Maxwell® 16 Instrument Technical Manual* specific for your instrument for directions.

Materials to Be Supplied by the User

- optional, rotating tube mixer for liquid blood samples
- benchtop vortex mixer
- pipettors and pipette tips for sample transfer into prefilled reagent cartridges
- 1.5–2.0ml tubes for incubation of samples (e.g., ClickFit Microtube, 1.5ml [Cat.# V4741]; recommended to prevent the cap from opening during heating)
- heating block set at 56°C
- microcentrifuge (buccal swab protocol)
- buccal swabs (e.g., Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PD or 25-806 1PC)

3.A. Preparation of Whole Blood Samples (Cat.# AS1290)

Whole Blood Sample Processing Capacity

The total yield of genomic DNA from whole blood samples depends on the sample volume and number of white blood cells/ml. Each cartridge supplied in the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Purification Kit is designed to purify genomic DNA from up to 300µl of whole blood, assuming an average number of white blood cells in the range of 4×10^6 to 1.1×10^7 /ml whole blood (values for a normal healthy adult; 1).

Note: Whole blood samples collected in EDTA, ACD or heparin tubes can be used. These samples may be either fresh or frozen. Frozen samples should be thawed before processing. We recommend mixing all blood samples before use. EDTA blood collection tubes are preferred if the purified DNA will be used in downstream amplification assays.

1. Mix all blood samples for at least 5 minutes at room temperature.
2. Prepare and label incubation tubes compatible with heating block.
3. Add 30µl of Proteinase K (PK) Solution to each incubation tube.
4. Add liquid blood (up to 300µl) to each incubation tube.
5. Add 300µl of Lysis Buffer to each incubation tube.
6. Vortex each tube for 10 seconds.
7. Incubate each tube in the heating block (set to 56°C) for 20 minutes. During this incubation, prepare cartridges as described in Section 3.C.
8. Transfer each blood lysate sample from the incubation tube to well #1 of each cartridge. (Well #1 is the well closest to the cartridge label and furthest from the user.)

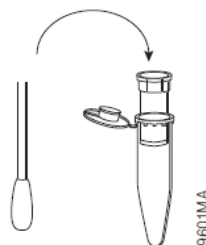
3.B. Preparation of Buccal Swab Samples (Cat.# AS1295)

Buccal Swab Sample Processing Capacity

The total yield of genomic DNA from buccal swab samples depends on the cellular material contained on the swabs. Each cartridge supplied in the Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit is designed to purify genomic DNA from 1 or 2 buccal swabs.

Note: Customers have performed this protocol successfully with samples collected using Pur-Wraps Sterile Polyester Tipped Applicators, Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PD or Pur-Wraps Sterile Cotton Tipped Applicators, Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PC. We also recommend using Promega ClickFit Microtube, 1.5ml (Cat.# V4741) for sample preparation.

1. Collect samples with a standard buccal swab collection procedure.
2. Assemble a Clearing Column/microtube for each sample.
3. Cut the head off the applicator stick. Add dried swab head to the Clearing Column/microtube assembly.
4. In a separate tube, mix 300µl Lysis Buffer + 30µl Proteinase K for each sample.
5. Add 330µl of Lysis Buffer/Proteinase K to swab head in the Clearing Column/microtube assembly.
6. Close tube over the Clearing Column and vortex for 10 seconds.
Note: If using tubes other than the recommended Cat.# V4741, the tube may not close.
7. Incubate for 20 minutes at 56°C.
Note: Some flowthrough from the column may be observed in the microtube after incubation. This is normal.
8. Centrifuge the Clearing Column/microtube assembly with swab for 2 minutes at maximum speed.
9. Remove the Clearing Column with swab head and discard.
10. Add flowthrough to well #1 of the Maxwell® 16 LEV cartridge (see Section 3.C for cartridge preparation).
11. Process using Maxwell® 16 in LEV Research Mode using the LEV Blood method (see Section 4).
12. Once the extraction is complete, remove and cap each elution tube. Store appropriately until use.



3.C. Maxwell® 16 Cartridge Preparation

1. Change gloves before handling cartridges, LEV Plungers and Elution Tubes. Place the cartridges to be used in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack (Cat.# AS1251). Place each cartridge in the rack with the label side facing away from the Elution Tubes. Press down on the cartridge to snap it into position. Carefully peel back the seal so that all plastic comes off the top of the cartridge. Ensure that all sealing tape and any residual adhesive are removed before placing cartridges in the instrument.
2. Place one plunger into well #8 of each cartridge.
3. Place an empty Elution Tube into the Elution Tube position for each cartridge in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack. Add 50µl of Elution Buffer to the bottom of each Elution Tube.

Notes:

1. If you are processing fewer than 16 samples, center the cartridges on the platform.
2. Specimen or reagent spills on any part of the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack should be cleaned with a detergent-water solution, followed by a bacteriocidal spray or wipe, then water. Do not use bleach on any instrument parts.

Well	Contents	User Adds:
1	Binding Buffer	Sample
2	Paramagnetic Cellulose Particles	
3	Wash Buffer	
4	Wash Buffer	
5	Wash	
6	Wash	
7	Water	
8	Empty	Plunger

Figure 1. Maxwell® 16 LEV DNA Purification Cartridge. This figure shows the contents of a cartridge. In all cases, lysate sample is added to well #1.

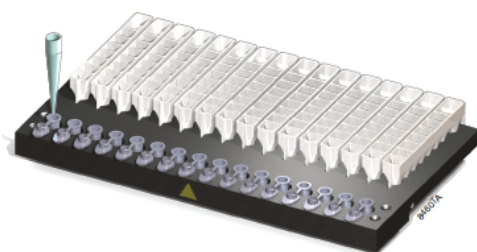


Figure 2. Setup and configuration in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack. Elution Buffer is added to the Elution Tubes as indicated.

4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments

Setup for AS2000 Maxwell® 16 Instruments

Refer to the *Maxwell® 16 Instrument Operating Manual #TM295* for more detailed information.

To run the “Blood” protocol, you must have Maxwell® 16 firmware version 4.71 or higher installed on your instrument.

1. Turn on the Maxwell® 16 Instrument. The instrument will power up, display the firmware version number, proceed through a self-check and home all moving parts.
2. Verify that the instrument settings indicate an “LEV” hardware configuration and “Rsch” operational mode setting.
3. Select “Run” on the Menu screen, and press the Run/Stop button to start the method.
4. Select “DNA” on the menu screen, then select “OK” at the Verification screen.
5. Select “Blood” on the Menu screen, then select “OK” at the Verification screen. “Blood” Method is used for both kits (Cat.# AS1290 and AS1295).
6. Open the door when prompted to do so on the screen. Press the Run/Stop button to extend the platform.



Warning: Pinch point hazard.

7. Transfer the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack containing the prepared cartridges on the Maxwell® 16 Instrument platform. Ensure that the rack is placed in the Maxwell® 16 Instrument with the Elution Tubes closest to the door. The rack will only fit in the instrument in this orientation. If you have difficulty fitting the rack on the platform, check that the rack is in the correct orientation. Ensure that the cartridge rack is level on the instrument platform.

Note: Hold the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack by the sides to avoid dislodging cartridges from the rack.

8. Verify that samples were added to well #1 of the cartridges, cartridges are loaded on the instrument, Elution Tubes are present with 50µl of Elution Buffer and LEV Plungers are in well #8.
9. Press the Run/Stop button. The platform will retract. Close the door.



Warning: Pinch point hazard.

10. The Maxwell® 16 Instrument will immediately begin the purification run. The screen will display the steps performed and the approximate time remaining in the run.

Notes:

1. Pressing the Run/Stop button or opening the door will pause the run.
 2. If the run is abandoned before completion, the instrument will wash the particles off the plungers and eject the plungers into well #8 of the cartridge. The sample will be lost.
11. When the automated purification run is complete, the LCD screen will display a message that the method has ended.

End of Run

12. Follow on-screen instructions at the end of the method to open door. Verify that plungers are located in well #8 of the cartridge at the end of the run. If plungers are not removed from the magnetic plunger bar, push them down gently by hand to remove them.
13. Press the Run/Stop button to extend the platform out of the instrument.
14. Remove the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack from the instrument. Remove Elution Tubes containing DNA, and close the tubes.



Note: Following the automated purification procedure, the LEV Cartridge Rack will be warm. It will not be too hot to touch. To remove the rack from the instrument platform, hold onto the sides of the rack.



15. Remove the cartridges and plungers from the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack, and discard as hazardous waste. Do not reuse reagent cartridges, LEV Plungers or Elution Tubes.

Setup for AS3000 Maxwell® 16 MDx Instruments

Refer to the *Maxwell® 16 MDx Instrument Technical Manual #TM320* for detailed information. To run the “Blood” protocol, you must have the Maxwell® 16 Firmware version 1.10 or higher installed on your instrument

1. Turn on the Maxwell® 16 MDx Instrument. The instrument will power up, display the firmware version number, proceed through a self-check and home all moving parts.
2. Verify that the Home screen indicates “LEV” and the LEV hardware is present. Press “Run” to continue.
3. Enter user and PIN, if this option is enabled.
4. At the Protocols screen, select “DNA”.
5. At the Method screen, select “Blood”.
6. On the next screen, verify that the correct user was chosen. The protocol should read “DNA”. Select “Run/Stop” to continue.

4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments (continued)

7. Open the door when prompted on the screen, then select "Run/Stop".



Warning: Pinch point hazard.

8. Follow on-screen instructions for bar code reader input if this option is enabled.
9. Transfer the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack containing the prepared cartridges on the Maxwell® 16 Instrument platform. Ensure that the rack is placed in the Maxwell® 16 Instrument with the Elution Tubes closest to the door. The rack will only fit in the instrument in this orientation. If you have difficulty fitting the rack on the platform, check that the rack is in the correct orientation. Ensure the rack is level on the instrument platform.
- Note:** Hold the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack by the sides to avoid dislodging cartridges from the rack.
10. Verify that samples were added to well #1 of the cartridges, cartridges are loaded on the instrument, Elution Tubes are present with 50µl of Elution Buffer and LEV Plungers are in well #8.
11. Press the Run/Stop button. The platform will retract. Close the door.



Warning: Pinch point hazard.

The Maxwell® 16 Instrument will immediately begin the purification run. The screen will display the approximate time remaining in the run.

Notes:

1. Pressing the Run/Stop button or opening the door will pause the run.
 2. If the run is abandoned before completion, the instrument will wash the particles off the plungers and eject the plungers into well #8 of the cartridge. The samples will be lost.
12. When the automated purification run is complete, follow instructions on the screen for data transfer. For detailed instructions, refer to the *Maxwell® 16 MDx Instrument Technical Manual #TM320* and *Maxwell® Sample Track Software Technical Manual #TM314*.

End of Run

13. Follow on-screen instructions at the end of the method to open door. Verify that plungers are located in well #8 of the cartridge at the end of the run. If plungers are not removed from the magnetic plunger bar, push them down gently by hand to remove them.

14. Press the Run/Stop button to extend the platform out of the instrument.

15. Remove the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack from the instrument.
Remove Elution Tubes containing DNA, and cap the tubes.



Note: Following the automated purification procedure, the LEV Cartridge Rack will be warm. It will not be too hot to touch. To remove the rack from the instrument platform, hold onto the sides of the rack.

16. Remove the cartridges and plungers from the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack, and discard as hazardous waste. Do not reuse reagent cartridges, LEV Plungers or Elution Tubes.



For the Maxwell® 16 MDx Instrument, ensure samples are removed before the UV light treatment to avoid damage to the nucleic acid.

5. Reference

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

Annexe 6 : Séquence de *MREG* réannotée avec surlignement des amorces pour le séquençage moléculaire et mise en évidence des SNPs

MREG Chat d'Ensembl modifié

Transcript: ENSFCAT00000004544

5'

tcatgacctgagctgaagtcaaagagtctgacgcttaaccggctgagccaccaggttt
gttctctgccagtttcaaagtgatttttaaaattgttctattgtgctatgcttaattatt
ggagacaataattcataccttgtcattagaaacatatgtatttatattatgttttata
ttatagggtatatagtgtatcttttatttgttatcatatgttacatacatgggatgcata
tattatatataattacatacattgtgaaatgcttataccctttttttaaacaccacagc
GATAGCAATCCATATTCTTCATTTGGAGCGACGCTGGTGAGAGATGATGAAAAGAAATTG
TGGAGCATGCCTCACGATGCGTCCACACAGAGGCAGACGACACCGAATCCTGTACAAT
TTGATAGTCGTTCGAAATCAGCAGGCCAAAGATTCAGAG
gtaagcaagcccttttgagatcttgcgtgtgtgcccgatgacaatggccaataacacatag
cgggtgagtgagaaggccagctgggaataaagaaaaaagaggaaaggaggagatgtttggaat
gagggcaggtatttttagcagcctgtggtgctaattatagctggtcctggtagaccggt
cgataaacagataagactgacttccagttattacctcaattgtgcaagggttacagaaac
.....
gtggggctccatgctgtcagcctgcttgggattctctctctctgcccctccccttattgc
tttctctgtctctctctctctcaaaataagtaataacacttaaaaaattaaagaaaaata
agaaagttttgatgcttagtgaagaggagaacacacatgtctctctctctgtttggg
aattagatagcagtgtaggccaaggataaaaaataaaactgaatttttattttcctacag
GAGTGGCAAAACTCAACTATGATATCTACACCTGCGACAGATTCTGAAGGGAAGTGAGG
AATAGGTGGAACGCATTTTAGAAGATTTAG
gtgagtcgggaagtgattatgacatgatacaataactagcgggtgatcattcctcttccc
tttctctctgcatggtttttataaaagtcatattgtactggtggtggttaaaagtaactgtg
tactaattattttcccaatcctatccgccttgatcctcaagcataaacatctgatgttt
ctgttacaccaaccgatgtcctgaggacatagtttgccatgcgttatgccatctgtcctc
.....
gaccgcgagatcgtgacctggctgaagtgcggcgcttaaccgggcttaaccaggcgcccat
caaagtgcctttaattaaagaccccgctgatcatactgacctggaaagtagcacatggag
aggtgccttggttccgctgtgtgtttggaacccacatttggggtgccttcttaattctct
gcaggaccaccgtgtcctgtgactgcttttacacgagggatacatTTTTTTTccccacag
GCTTTCAAAGGAAGCAGACTCTTTGTTGTGTCAGTGACGAACTCAGCACCATCAGTGATT
CCAAAAACACAAGGAAAGCTCGGGAGATATTGTTAAGATTGGCTGAGGAAACCAATATTT
TTCCAGCAAGTTGGGAGCTCTCGGAGAGATATCTCTTTGTTGTG
gtaagtggatataatatatatatatataaagtttatatattttgagagagagaatgtg
agcaggggaagggcgagagagagagcagagagagaagaatcttaagcaggggttcaactgt
cagcacggagcctgacttggggctccatcctaggaactgaaccttgagatcatgacctga
gccaaaatgaagagtcagacactcaatcaagtgaagccaccagtggtatgtgattaaaaaa
.....
aacgttgtttacataacctaagattaacaaaggggttgaaagggcactaagaatgtttct
tgaataatgtaagcaaaggggtgaaggatattcttaaatgttgagaaaaatttaagat
gtgttttgccttgccatgattatttccaggctgggtgtatgggtgtgttttaggtgtttt
ccattgacgtggctttgttccatcttgacaacatttgatTTTTTTTaaatctttggcag
GACCGTCTTATTGCTCTTGATGCAGCAGAAGAGTTCTTTAAAATTGCCAGTCGAATTAT
CCCAAGAAACCTGGGGTCCCAAACCTGGCAGATGGCCAGAAAGAA
CTGCACTACCTTCCATTTCGAAGTCCCtaaggagagggctgggagggcagagctgggattc
cccacggggactcaacagccagcccaagtggaacaaatggcacaaggagaccgtaagcac
gtggagggccagtttaagtgaataatgattctaaatcctataaaaaactaggggtttggac
atctggtcttcatgaggatgcctctgtaggaaaaattcaggttgactgaaacagggctgg
tgatcttgcacagggaggttaggggtgatatttctcatgggagattggatttcaagagcc
cattgtccccatttgggttttgggtgtacaataaaactcttgtcaccaagcctattggggg

ATG

SNP1
A/G

1F

Exon 1 : 245 pb

SNP2
A/G

1R

2F

Exon 2 : 91 pb

2R

SNP3
A/G

3F

Exon 3 : 164 pb

3R

SNP4
C/T

4F

Exon 4 : 132 pb

STOP

4R

aatggggtgctctagttaggaaaacaataagattgatagagctattggtgagcccaata
tggattactgcattttaaataattattatataatataggctaatagccaaaataacgccag
gcattatgtgacctttcttggtttgggagaccctccaggaccttgagggtgtcagaggc
atcattttgaatatgagttatgtattcagaggtttagatacggtagatgatgggaatata
atatctaagagtgtctgcagaaggagttccaaatagatcgatccaggcagagcttcc
ttcagctctgtcttcagttgtgggacacacgtcttaaattctaaatattagcaatacctg
gttacctcatTTTTacatactatccatttctagacccaagcccttgatatttcacTgg
aatagcatctgtacactggaatgtttgacctccaattccttctcttctctttaatctgtt
tctggcgtcttggtgagagTTGTACCTGCCCAGTGACCTTtagCACAGACTTGTGTCTC
TGCGTCTGCAGGCAATATTGCACGGA

MREGex56F

agaaggtcattgctgtactttcttcattcagaagaggatttccaagatggagcagtgt
gaattacagcttgcttctagccacagactgagaagtccagcctcaaaagttaactgccac
ttaagcaaggaggttgccaggaaatcatggttcattgttactgaaaagactttcagaacct
gtaggatttaccatagattgctgagaacaatggcgatattttacttttacagcctttg

MREGex56R

BIBLIOGRAPHIE

ABERDAM E, BERTOLOTTO C, SVIDERSKAYA EV, DE THILLOT V, HEMESATH TJ, FISHER DE *et al.* (1998). Involvement of Microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein. *J Biol Chem*, **273**, 19560-19565

ADACHI S, MORII E, KIM D, OGIHARA H, JIPPO T, ITO A *et al.* (2000). Involvement of mi-transcription factor in expression of alphanelanocyte-stimulating hormone receptor in cultured mast cells of mice. *J Immunol*, **164**, 855-860

ANCANS J, THODY AJ (2000). Activation of melanogenesis by vacuolar type H⁺-ATPases inhibitors in amelanotic, tyrosinase positive human and mouse melanoma cells. *FEBS Lett*, **478**, 57-60

ANCANS J, TOBIN D.J, HOOGDUIJN M.J, SMIT NP, WAKAMATSU K, THODY AJ (2001). Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res*, **268**, 26-35

ANDO H, NIKI Y, YOSHIDA M, ITO M, AKIYAMA K, KIM JH *et al.* (2011). Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. *Cell Logist*, **1**(1), 12-20

ANISTOROEI R, KROGH AK, CHRISTENSEN K (2013). A frameshift mutation in the LYST gene is responsible for the Aleutian color and the associated Chediak-Higashi syndrome in American mink. *Anim Genet*, **44**(2), 178-183

ARAKI K, HORIKAWA T, CHAKRABORTY AK, NAKAGAWA K, ITOH H, OKA M *et al.* (2000). Small GTPase rab3A is associated with melanosomes in melanoma cells. *Pigment Cell Res*, **13**, 332-336

ASPENGREN S, HEDBERG D, WALLIN M (2006). Studies of pigment transfer between *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts in vitro and in vivo. *Pigment Cell Res*, **19**, 136-145

AUBIN-HOUZELSTEIN G (1997). Les gènes de pigmentation chez la souris. Thèse Méd. Vét, Alfort, n° 75, 135p

BALDWIN CT, LIPSKY NR, HOTH CF, COHEN T, MAMUYA W, MILUNSKY A (1994). Mutations in PAX3 associated with Waardenburg syndrome type I. *Hum Mutat*, **3**, 205-211

BASRUR V, YANG F, KUSHIMOTO T, HIGASHIMOTO Y, YASUMOTO K, VALENCIA J *et al.* (2003). Proteomic analysis of early melanosomes : identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res*, **2**, 69-79

BASSI MT, BERGEN AA, BITOUN P, CHARLES SJ, CLEMENTI M, GOSSELIN R *et al.* (2001). Diverse prevalence of large deletions within the OA1 gene in ocular albinism type 1 patients from Europe and North America. *Hum Genet*, **108**, 51-54

BENNETT DC, LAMOREUX ML (2003). The color loci of mice – a genetic century. *Pigment Cell Res*, **16**(4), 333-344

BENTLEY NJ, EISEN T, GODING CR (1994). Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter : activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol*, **14**, 7996-8006

BERGSMA DR, BROWN KS (1971). White fur, blue eyes, and deafness in the domestic cat. *J Hered*, **62**, 171-185

BERSON JF, HARPER DC, TENZA D, RAPOSO G, MARKS MS (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell*, **12**, 3451-3464

BERTOLOTTO C, BUSCA R, ABBE P, BILLE K, ABERDAM E, ORTONNE JP *et al.* (1998b). Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclin AMP: Pivotal role of Mboxes (GTCATGTGCT) and of Microphthalmia. *Mol Cell Biol*, **18**, 694-702

BERTOLOTTO C, ORTONNE JP, BALLOTTI (1996). Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol*, **134**, 747-755

BLOIS MS (1968). Phagocytosis of melanin particles by human epidermal cells in vitro. *J Invest Dermatol*, **50**, 336-337

BÖHM M, MOELLMANN G, CHENG E, ALVAREZ-FRANCO M, WAGNER S, SASSONE CORSI P *et al.* (1995). Identification of p90Rsk as the probable CRE-Ser133 kinase in melanocytes. *Cell Growth Diff*, **6**, 291-302

BOISSY RE, NORDLUND JJ (1997). Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res*, **10**(1-2), 12-24

BOISSY RE, RICHMOND B, HUIZING M, HELIP-WOOLEY A, ZHAO Y, KOSHOFFER A *et al.* (2005). Melanocyte-specific proteins are aberrantly trafficked in melanocytes of Hermansky-Pudlak syndrome-type 3. *Am J Pathol*, **166**, 231-240

BRILLIANT MH (2001). The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res*, **14**, 86-93

BRISSON A (1989). De quelle couleur seront mes chatons? Abrégé de la génétique de la robe. Ed. Le point vétérinaire, Maisons Alfort, 104p

BRISSON A (2012). Le nouveau chat de race-Conseils d' élevage et abrégé de génétique de la robe. Ed. Cophipublishing, 286p

BURGO A, SOTIRAKIS E, SIMMLER MC, VERRAES A, CHAMOT C, SIMPSON JC *et al.* (2009). Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth. *EMBO Rep*, **10**(10), 1117-1124

CANTALUPO G, ALIFANO P, ROBERTI V, BRUNI CB, BUCCI C (2001). Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J*, **20**(4), 683-693

CERDAN D, REDZINIAK G, BOURGEOIS CA, MONSIGNY M, KIEDA C (1992). C32 human melanoma cell endogenous lectins : characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes ; *Exp Cell Res*, **203**, 164-173

CESARINI JP (1995). Les troubles de la pigmentation. In :42^{ème} séminaire « Peau et pelage », Artigues-près-Bordeaux, 10-11 novembre 1995, Société Française de Cynotechnie, 234-241

CHABRILLAT ML, WILHELM C, WASMEIER C, SVIDERSKAYA V, LOUVARD D, COUDRIER E (2005). Rab8 regulates the actin-based movement of melanosomes. *Mol Biol Cell*, **16**(4), 1640-1650

CHELI Y, LUCIANI F, KHALED M, BEURET L, BILLE K, GOUON P et al. (2009). α MSH and cyclic AMP elevating agents control melanosome pH through a protein kinase A-independent mechanism. *J Biol Chem*, **284**, 18699-18706

CHI A, VALENCIA JC, HU ZZ, WATABE H, YAMAGUCHI H, MANGINI NJ et al. (2006). Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res*, **5**(11), 3135-3144

CHINTALA S, LI W, LAMOREUX ML, ITO S, WAKAMATSU K, SVIDERSKAYA EV et al. (2005). Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(31), 10964-10969

CHOI W, WOLBER R, GERWAT W, MANN T, BATZER J, SMUDA C et al. (2010). The fibroblast derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin. *J Cell Sci*, **123**, 3102-3111

COOPER MP, FRETWELL N, BAILEY SJ, LYONS LA (2006). White spotting in the domestic cat (*Felis catus*) maps near KIT on feline chromosome B1. *Anim Genet*, **37**, 163-165

CORRE S, GALIBERT MD (2006). USF as a key regulatory element of gene expression. *Med Sci*, **22**, 62-67

CORRE S, PRIMOT A, SVIDERSKAYA E, BENNETT DC, VAULONT S, GODING CR et al. (2004). UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem*, **279**, 51226-51233

CUI R, WIDLUND HR, FEIGE E, LIN JY, WILENSKY DL, IGRAS VE et al. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*, **128**, 853-864

DAMEK- POPRAWA M, DIEMER T, LOPES VS, LILLO C, HARPER DC, MARKS MS et al. (2009). Melanoregulin (MREG) modulates lysosome function in pigment epithelial cells. *J Biol Chem*, **284**(16), 10877-10889

DELEVOYE C, GIORDANO F, VAN NIEL G, RAPOSO G (2011). La biogenèse des mélanosomes : l'échiquier de la pigmentation. *Med Sci*, **27**(2), 153-162

DELEVOYE C, HURBAIN I, TENZA D, SIBARITA JB, UZAN-GAFSOU S, OHNO H et al. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol*, **187**, 247-264

DI PIETRO SM, DELL'ANGELICA EC (2005). The cell biology of Hermansky-Pudlak syndrome: recent advances. *Traffic*, **6**(7), 525-533

DI PIETRO SM, FALCON-PEREZ JM, DELL'ANGELICA EC (2004). Characterization of BLOC-2, a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome proteins HPS3, HPS5 and HPS6. *Traffic*, **5**, 276-283

- DI PIETRO SM, FALCON-PEREZ JM, TENZA D , SETTY SR, MARKS MS, RAPOSO G et al. (2006). BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Mol Biol Cell*, **17**, 4027-4038
- DICKENS D (2006). Dilute modifier in Scandinavia. *ACF Yearbook* 2006
- DIEKMANN Y, SEIXAS E, GOUW M, TAVARES-CADETE F, SEABRA MC, PEREIRA-LEAL JB (2011). Thousands of Rab GTPases for the cell biologist. *PLoS Comput Biol*, **7**(10), e1002217
- DRÖGEMÜLLER C, RÜFENACHT S, WICHERT B, LEEB T (2007). Mutations within the FGF5 gene are associated with hair length in cats. *Anim Genet*, **38**, 218-221
- DU J, MILLER AJ, WIDLUND HR, HORSTMANN MA, RAMASWAMY S, FISHER DE (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol*, **163**(1), 333-343
- DULAC C (1993). Le développement embryonnaire du système mélanocytaire et sa pathologie. *Med Sci*, **9**(4), 417-424
- DURCHFORT N, VERHOEF S, VAUGHN MB, SHRESTHA R, ADAM D, KAPLAN J et al. (2012). The enlarged lysosomes in beige cells result from decreased lysosome fission and not increased lysosome fusion. *Traffic*, **13**(1), 108-119
- EIZIRIK E, DAVID VA, BUCKLEY-BEASON V, ROELKE ME, SCHÄFFER AA, HANNAH SS et al. (2010). Defining and mapping mammalian coat pattern genes: multiple genomic regions implicated in domestic cat stripes and spots. *Genetics*, **184**, 267-275
- EIZIRIK E, YUHKI N, JOHNSON WE, MENOTTI-RAIMOND M, HANNAH SS, O' BRIEN SJ (2003). Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol*, **13**, 448-453
- EURELL JA, FRAPPIER BL (2006). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*, 6^{ème} ed., Ames : Blackwell Publishing, 405p
- FARGEAS J (1995). Physiologie de la peau et du poil. In : 42^{ème} séminaire « Peau et pelage », Artigues-près-Bordeaux, 10-11 novembre 1995, Société Française de Cynotechnie, 49-91
- FIGUEIREDO AC, WASMEIER C, TARAFDER AK, RAMALHO JS, BARON RA, SEABRA MC (2008). Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *J Biol Chem*, **283**(34), 23209-23216
- FITZPATRICK TB, BREATHNACH AS (1963). The epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr*, **147**, 481-489
- FUKUDA M (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci*, **65**(18), 2801-2813
- FUKUDA M, KURODA TS, MIKOSHIBA K (2002). Slac2-a/Melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va : implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem*, **277**(14), 12432-12436

FULLER BB, SPAULDING DT, SMITH DR (2001). Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp Cell Res*, **262**, 197-208

FUSE N, YASUMOTO KI, SUZUKI H, TAKAHASHI K, SHIBAHARA S (1996). Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Com*, **219**, 702-707

GALIBERT MB, CARREIRA S, GODING CR (2001). The USF-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates U-V induced Tyrosinase expression. *EMBO J*, **20**, 5022-5031

GALIBERT MD, YAVUZER U, DEXTER TJ, GODING CR (1999). Pax3 and regulation of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *J Biol Chem*, **274**, 26894-26900

GANDOLFI B, OUTERBRIDGE CA, BERESFORD LG, MYERS JA, PIMENTEL M, ALHADDAD H *et al.* (2010). The naked truth: Sphynx and Devon Rex cat breed mutations in KRT71. *Mamm Genome*, **21**, 509-515

GARCIA RI, FLYNN E, SZABO G (1979). Ultrastructure of melanocyte-keratinocyte interactions. *Pigment Cell Res*, **4**, 299-307

GAUTAM R, CHINTALA S, LI W, ZHANG Q, TAN J, NOVAK EK *et al.* (2004). The Hermansky-Pudlak syndrome 3 (cocoa) protein is a component of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-2 (BLOC-2). *J Biol Chem*, **279**, 12935-12942

GAUTAM R, NOVAK EK, TAN J, WAKAMATSU K, ITO S, SWANK RT (2006). Interaction of Hermansky-Pudlak Syndrome genes in the regulation of lysosome-related organelles. *Traffic*, **7**, 779-792

GINGER RS, ASKEW SE, OGBORNE RM, WILSON S, FERDINANDO D, DADDT *et al.* (2008). SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis. *J Biol Chem*, **283**, 5486-5495

GIORDANO F, BONETTI C, SURACE EM, MARIGO V, RAPOSO G (2009). The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum Mol Genet*, **18**, 4530-4545

GODING CR (2000). Mitf from neural crest to melanoma : signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes dev*, **14**(14), 1712-1728

GRAHAM A, WAKAMATSU K, HUNT G, ITO S, THODY A.J (1997). Agouti protein inhibits the production of eumelanin and pheomelanin in the presence and absence of alpha-melanocyte stimulating hormone. *Pigment Cell Res*, **10**, 298-303

HIDA T, WAKAMATSU K, SVIDERSKAYA EV, DONKIN AJ, MONTOLIU L, LYNN LAMOREUX M *et al.* (2009). Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes : a cAMP-independant pathway. *Pigment Cell Melanoma Res*, **22**, 623-634

HILL HZ, HILL GJ (2000). UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. *Pigment Cell Res*, **13**, 140-144

HIROBE T (1995). Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histol Histopathol*, **10**, 223-237

HIROSAKI K, YAMASHITA T, WADA I, JIN H.Y, JIMBOW K (2002). Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require Rab7 for their intracellular transport. *J Invest Dermatol*, **119**(2), 475-480

HODGKINSON CA, MOORE KJ, NAKAYAMA A, STEIMGRIMSSON E, COPELAND NG, JENKINS NA *et al.* (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix- zipper protein. *Cell*, **74**, 395-404

HUANG L, KUO YM, GITSHIER J (1999). The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency. *Nat Genet*, **23**, 329-332

HUBER WE, PRICE ER, WIDLUND HR, DU J, DAVIS IJ, WEGNER M *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

HUGHES MJ, LINGREL JB, KRAKOWSKY JM, ANDERSON KP (1993). A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J Biol Chem*, **268**, 20687-20690

HUME AN, TARAFDER AK, RAMALHO JS, SVIDERSKAYA EV, SEABRA MC (2006). A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes. *Mol Biol Cell*, **17**(11), 4720-4735

HURBAIN I, GEERTS WJ, BOUDIER T, MARCO S, VERKLEIJ AJ, MARS MS *et al.* (2008). Electron tomography of early melanosomes: implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 19726-19731

IMES DL, GEARY LA, GRAHN RA, LYONS LA (2006). Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation. *Anim Genet*, **37**, 175-178

INNAMORATI G, PICCIRILLO R, BAGNATO P, PALMISANO I, SCHIAFFINO MV (2006). The melanosomal/lysosomal protein OA1 has properties of a G protein-coupled receptor. *Pigment Cell Res*, **19**, 125-135

INTRONE W, BOISSY RE, GAHL WA (1999). Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab*, **68**(2), 283-303

IORDANOV M, BENDER K, ADE T, SCHMID W, SACHSENMAIER C, ENGEL K *et al.* (1997). CREB is activated by UVC through a p38/Hog-1-dependent protein kinase. *EMBO J*, **16**, 1009-1022.

ISHIDA Y, DAVID VA, EIZIRIK E, SCHÄFFER AA, NEELAM BA, ROELKE ME *et al.* (2006). A homozygous single-base deletion in MLPH causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat. *Genomics*, **88**, 698-705

ITO S, WAKAMATSU K (2006). Chemistry of Melanins, *In*: NORDLUND J.J, BOISSY R.E, HEARING V.J, KING R.A, OETTING W.S, ORTONNE J.P, editors. *The pigimentary system. Physiology and pathophysiology*. 2^d ed. Blackwell Publishing, Oxford, 282-310

ITO S, WAKAMATSU K (2008). Chemistry of mixed melanogenesis-pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol*, **84**(3), 582-592

ITOH T, FUKUDA M (2006). Identification of EPI64 as a GTPase-activating protein specific for Rab27A. *J Biol Chem*, **281**(42), 31823-31831

JACKSON IJ (1994). Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet*, **28**, 189-217

JIMENEZ CERVANTES C, SOLANO F, KOBAYASHI T, URABE K, HEARING V.J, LOZANO J.A *et al.* (1994). A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related-protein-1 (TRP1). *J Biol Chem*, **269**, 17993-18001

JORDAN SA, JACKSON IJ (1998). Melanocortin receptors and antagonists regulate pigmentation and body weight. *Bio Essays*, **20**, 603-606

JORDENS I, FERNANDEZ-BORJA M, MARSMAN M, DUSSELJEE S, JANSSEN L, CALAFAT J *et al.* (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*, **11**(21), 1680-1685

JORDENS I, WESTBROEK W, MARSMAN M, ROCHA N, MOMMAAS M, HUIZING M *et al.* (2006). Rab7 and Rab27A control two motor protein activities involved in melanosomal transport. *Pigment Cell Res*, **19**(5), 412-423

KADEKARO AL, KAVANAGH RJ, WAKAMATSU K, ITO S, PIPITONE MA, ABDELMALEK ZA (2003). Cutaneous photobiology. The melanocyte vs the sun : who will win the final round ?. *Pigment Cell Res*, **16**, 434-447

KAWAKAMI A, SAKANE F, IMAI S, YASUDA S, KAI M, KANO H *et al.* (2008). Rab7 regulates maturation of melanosomal matrix protein gp100/Pmel117/Silv. *J Invest Dermatol*, **128**(1), 143-150

KEHLER JS, DAVID VA, SCHÄFFER AA, BAJEMA K, EIZIRIK E, RYUGO DK *et al.* (2007). Four independent mutations in the feline fibroblast growth factor 5 gene determine the long-haired phenotype in domestic cats. *J Hered*, **98**, 555-566

KOBAYASHI T, URABE K, WINDER A.J, JIMENEZ CERVANTES C, IMOKAWA G, BREWINGTON T *et al.* (1994). Tyrosinase-related-protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J*, **13**(24), 5818-5825

KONDO T, HEARING VJ (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol*, **6**, 97-108

KRAMER JW, DAVIS WC, PRIEUR DJ (1977). The Chediak-Higashi syndrome of cats. *Lab Invest*, **36**(5), 554-562

KUHLBRODT K, HERBARTH B, SOCK E, HERMANS-BORGMEYER I, WEGNER M (1998). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci*, **18**, 237-250

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 (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

- KUSHIMOTO T, BASRUR V, VALENCIA J, MATSUNAGA J, VIEIRA WD, FERRANS VJ *et al.* (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 10698-10703
- LAMASON R.L, MOHIDEEN MA, MEST J.R, WONG AC, NORTON HL, AROS MC *et al.* (2005). SLC24A5 a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, **310**, 1782-1786
- LAMOREUX ML, WAKAMATSU K, ITO S (2001). Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res*, **14**(1), 23-31
- LAND EJ, ITO S, WAKAMATSU K, RILEY PA (2003). Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment Cell Res*, **16**(5), 487-493
- LIN JY, FISHER DE (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, **445**(7130), 843-850
- LOFTUS SK, LARSON DM, BAXTER LL, ANTONELLIS A, CHEN Y, WU X *et al.* (2002). Mutation of melanosome protein RAB38 in *chocolate* mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**(7), 4471-4476
- LOPEZ VM, DECATUR CL, STAMER WD, LYNCH RM, McKAY BS (2008). L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol*, **6**:e236
- LOWINGS P, YAVUZER U, GODING CR (1992). Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol Cell Biol*, **12**, 3653-3662
- LUO L (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, **1**(3), 173-180
- LYONS LA, BAILEY SJ, BAYSAC KC, BYRNS G, ERDMAN CA, FRETWELL N *et al.* (2006). The Tabby cat locus maps to feline chromosome B1. *Anim Genet*, **37**, 383-386
- LYONS LA, IMES DL, RAH HC, GRAHN RA (2005). Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*). *Anim Genet*, **36**, 119-126
- MENOTTI-RAYMOND M, DAVID VA, EIZIRIK E, ROELKE ME, GHAFARI H, O' BRIEN SJ (2009). Mapping of the domestic cat "SILVER" coat color locus identifies a unique genomic location for silver in mammals. *J Hered*, 100 Suppl 1:S8-13
- MOORE KJ (1995). Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet*, **11**, 442-448
- MOORE KJ, SEPERACK PK, STROBEL MC, SWING DA, COPLAND NG, JENKINS NA (1988b). Dilute suppressor *dsu* acts semidominantly to suppress the coat color phenotype of a deletion mutation, d^{120J} , of the murine dilute locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**(21), 8131-8135
- MOORE KJ, SWING DA, COPELAND NG, JENKINS NA (1994). The murine dilute suppressor gene encodes a cell autonomous suppressor. *Genetics*, **138**, 491-497
- MOORE KJ, SWING DA, COPELAND NG, JENKINS NA (1990). Interactions of the murine dilute suppressor gene (*dsu*) with fourteen coat color mutations. *Genetics*, **125**, 421-430

- MOORE KJ, SWING DA, RINCHIK EM, MUCENSKI ML, BUCHBERG AM, COPELAND NG *et al.* (1988a). The murine dilute suppressor gene *dsu* suppresses the coat-colour phenotype of three pigment mutations that alter melanocyte morphology, *d*, *ash* and *ln*. *Genetics*, **119**, 933-941
- MOREY C, AVNER P (2011). The demoiselle of X-inactivation: 50 years old and as trendy and mesmerising as ever. *PLoS Genet*, **7**:e1002212
- NAGLE DL, KARIM MA, WOOLF EA, HOLMGREN L, BORK P, MISUMI DJ *et al.* (1996). Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet*, **14**(3), 307-311
- NAPOLITANO A, DI DONATO P, PROTA G (2000). New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins : rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-o-quinonimine intermediate. *Biochim Biophys Acta*, **1475**, 47-54
- NEWTON JM, COHEN-BARAK O, HAGIWARA N, GARDNER JM, DAVISSON MT, KING RA (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet*, **69**, 981-988
- NGUYEN T, NOVAK EK, KERMANI M, FLUHR J, PETERS LL, SWANK RT (2002). Melanosome morphologies in murine models of hermannsky-pudlak syndrome reflect blocks in organelle development. *J Invest Dermatol*, **119**(5), 1156-1164
- NIEUWENHUIS HK, AKKERMAN JWN, SIXMA JJ (1987). Patient with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency : studies on one hundred six patients. *Blood*, **70**, 620-623
- NISHIMURA M, INOUE M, NAKANO T, NISHIKAWA T, MIYAMOTO M, KOBAYASHI T *et al.* (1989). Beige rat : a new animal model of Chediak-Higashi syndrome. *Blood*, **74**, 270-273
- NISSAN X (2010). Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'engagement épidermique des cellules souches pluripotentes humaines. Thèse de doctorat Université Evry Val d' Essone, 121p
- NYLANDER K, BOURDON JC, BRAY SE, GIBBS NK, KAY R, HART I *et al.* (2000). Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J Pathol*, **190**, 39-46
- O'SULLIVAN TN, WU XS, RACHEL RA, HUANG JD, SWING DA, MATESIC LE *et al.* (2004). *Dsu* functions in a MYO5A-independent pathway to suppress the coat color of dilute mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(48), 16831-16836
- OHBAIYASHI N, FUKUDA M (2012a). Role Of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics. *J Biochem*, **151**(4), 343-351
- OHBAIYASHI N, MARUTA Y, ISHIDA M, FUKUDA M (2012b). Melanoregulin regulates retrograde melanosome transport through interaction with the RILP-p150^{Glued} complex in melanocytes. *J Cell Sci*, **125**, 1508-1518
- OHBAIYASHI N, YATSU A, TAMURA K, FUKUDA M (2012c). The Rab21-GEF activity of Varp, but not its Rab32/38 effector function, is required for dendrite formation in melanocytes. *Mol Biol Cell*, **23**(4), 669-678

- OKAZAKI K, USUKA M, MORIKAWA F, TODA K, SEIJI M (1976). Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J Invest Dermatol*, **67**, 541-547
- OLIVARES C, JIMENEZ-CERVANTES C, LOZANO JA, SOLANO F, GARCIA BORRON JC (2001). The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J*, **354**, 131-139
- OZEKI H, ITO S, WAKAMATSU K, HIROBE T (1995). Chemical characterization of hair melanins in various coat colour mutants of mice. *J Invest Dermatol*, **105**(3), 361-366
- PADGET GA, LEADER RW, GORHAM JR, O'MARY CC (1964). The familial occurrence of the Chediak-Higashi syndrom on mink and cattle. *Genetics*, **49**, 505-512
- PALUMBO A, D' ISCHIA M, PROTA G (1987). Tyrosinase-promoted oxydation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates, *Tetrahedron*, **43**, 4203-4206
- PALUMBO A, SOLANO F, MISURACA G , AROCA P, GARCIA BORRON JC, LOZANO JA *et al.* (1991). Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement on dopachrome. *Biochim Biophys Acta*, **1115**, 1-5
- PEROU CM, MOORE KJ, NAGLE DL, MISUMI DJ, WOOLF EA, McGRAIL SH *et al.* (1996). Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet*, **13**(3), 303-308
- PETERSCHMITT M, GRAIN F, ARNAUD B, DELEAGE G, LAMBERT V (2009). Mutation in the melanocortin 1 receptor is associated with amber colour in the Norwegian Forest Cat. *Anim Genet*, **40**, 547-552
- PINGAULT V, BONDURAND N, KUHLBRODT K, GOERICH DE, PRE'HU MO, PULITI A *et al.* (1998). SOX10 mutations in patients with Waardenburgs-Hirschprung disease. *Nat Genet*, **18**, 171-173
- POTTER B, MEDENICA M (1968). Ultramicroscopic phagocytosis of synthetic melanin by epidermal cells in vivo. *J Invest Dermatol*, **51**, 300-303
- POTTERF SB, FURUMURA M, DUNN KJ, ARNHEITER H, PAVAN WJ (2000). Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet*, **107**, 1-6
- PREKERIS R, KLUMPERMAN J, CHEN YA, SCHELLER RH (1998). Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol*, **143**, 957-971
- PRICE ER, HORSTMANN MA, WELLS AG, WEILBEACHER KN, TAKEMOTO CM, LANDIS MW *et al.* (1998). Alpha Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression in microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem*, **273**, 33042-33047
- PURI N, GARDNER JM, BRILLIANT MH (2000). Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes. *J Invest Dermatol*, **115**, 607-613
- RABINOVITCH M (1995). Professional and non-professional phagocytes : an introduction. *Trends Cell Biol*, **5**, 85-87

RACHEL RA, NAGASHIMA K, O' SOLLIVAN TN, FROST LS, STEFANO FP, MARIGO V *et al.* (2012). Melanoregulin, product of the dsu locus, links the BLOC-pathway and OA1 in organelle biogenesis. *PLoS One*, **7**(9), e42446

RAPOSO G, MARKS MS (2007). Melanosomes : dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 786, 797

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**, 809-824

REISSMANN M, LUDWIG A (2013). Pleiotropic effects of coat colour associated mutations in humans, mice and other mammals. *Semin Cell Dev Biol*

ROUSSEAU K, KAUSEER S, PRITCHARD LE, WARHURST A, OLIVER RL, SLOMINSKI A *et al.* (2007). Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB J*, **21**, 1844-1856

RUSSELL ES (1946). A quantitative histological study of the pigment found in the coat-color mutants of the house mouse; variable attributes of the pigment granules. *Genetics*, **31**, 327-346

RUSSELL ES (1948). A quantitative histological study of the pigment found in the coat color mutants of the house mouse ; estimates of the total volume of pigment. *Genetics*, **33**(3), 228-236

RUSSELL ES (1949). A quantitative histological study of the pigment found in the coat-colour mutants of the house mouse ; the nature of the effects of genic substitution in five major allelic series. *Genetics*, **34**(2), 146-166

RUSTOM A, SAFFRICH R, MARKOVIC I, WALTHER P, GERDES HH (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, **303**, 1007-1010

SAEKI H, OIKAWA A (1985). Stimulation by ionophores of tyrosinase activity of mouse melanoma cells in culture. *J Invest Dermatol*, **85**, 423-425

SALAZAR G, CRAIGE B, STYERS ML, NEWELL LITWA KA, DOUCETTE MM, WAINER BH *et al.* (2006). BLOC-1 complex deficiency alters the targeting of adaptor protein complex-3 cargoes. *Mol Biol Cell*, **17**, 4014-4026

SATO-JIN K, NISHIMURA E.K, AKASAKA E, HUBER W, NAKANO H, MILLER A *et al.* (2008). Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J*, **22**, 1155-1168

SAUTET J (1995). Formation de la peau, du pigment et du pelage chez le chien, *In : 42^{ème} séminaire « Peau et pelage »*, Artigues-près-Bordeaux, 10-11 novembre 1995, Société Française de Cynotechnie, 3-39

SCHALLREUTER KU, HASSE S, ROKOS H, CHAVAN B, SHALBAF M, SPENCER JD *et al.* (2009). Cholesterol regulates melanogenesis in human epidermal melanocytes and melanoma cells. *Exp Dermatol*, **18**, 680-688

- SCHIAFFINO MV (2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 1094-1104
- SCHMIDT-KÜNTZEL A, EIZIRIK E, O' BRIEN SJ, MENOTTI-RAYMOND M (2005). Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *J Hered*, **96**, 289-301
- SCHMIDT-KÜNTZEL A, NELSON G, DAVID VA, SCHÄFFER AA, EIZIRIK E, ROELKE ME *et al.* (2009). A domestic cat X chromosome linkage map and the sex-linked orange locus: mapping of orange, multiple origins and epistasis over nonagouti. *Genetics*, **181**, 1415-1425
- SCHNAPP BJ, REESE TS (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 1548-1552
- SCOTT G, LEOPARDI S (2003). The cAMP signaling pathway has opposing effects on Rac and Rho in B16F10 cells : implications for dendrite formation in melanocytic cells. *Pigment Cell Res*, **16**(2), 139-148
- SCOTT G, LEOPARDI S, PRINTUP S, MADDEN BC (2002). Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci*, **115**, 1441-1451
- SCOTT G, ZHAO Q (2001). Rab3a and SNARE proteins : potential regulators of melanosome movement. *J Invest Dermatol*, **116**, 296-304
- SEIBERG M (2001). Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res*, **14**, 236-242
- SEIBERG M, PAINE C, SHARLOW E, ANDRADE-GORDON P, COSTANZO M, EISINGER M *et al.* (2000). The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res*, **254**, 25-32
- SETTY SR, TENZA D, SVIDERSKAYA EV, BENNETT DC, RAPOSO G, MARKS MS (2008). Cell-specific ATP7A transport sustains copperdependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature*, **454**, 1142-1146
- SHARLOW ER, PAINE CS, BABIARZ, EISINGER M, SHAPIRO S, SEIBERG M (2000). The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci*, **113**, 3093-3101
- SLOMINSKI A, TOBIN DJ, SHIBAHARA S, WORTSMAN J (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, **84**, 1155-1228
- SLOMINSKI A, WORTSMAN J (2000). Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev*, **21**, 457-487
- STEINGRIMSSON E, COPELAND NG, JENKINS NA (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Neuron*, **30**, 365-411
- STEINGRIMSSON E, COPELAND NG, JENKINS NA (2006). Mouse coat color mutations: from fancy mice to functional genomics. *Dev Dyn*, **235**, 2401-2411
- STENMARK H (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**(8), 513-525

STOLT CC, LOMMES P, HILLGARTNER S, WEGNER M (2008). The transcription factor Sox 5 modulates Sox 10 function during melanocyte development. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5427-5440

STUART LM, EZEKOWITZ RA (2005). Phagocytosis : elegant complexity. *Immunity*, **22**, 539-550

STURM RA (2009). Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet*, **18**, 9-17

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

SWEET HO (1983). Dilute suppressor, a new suppressor gene in the house mouse. *J Hered*, **74**(4), 305-306

TAMURA K, OHBAYASHI N, ISHIBASHI K, FUKUDA M (2011). Structure-function analysis of VPS9-ankyrin-repeat protein (Varp) in the trafficking of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Biol Chem*, **286**(9), 7507-7521

TAMURA K, OHBAYASHI N, MARUTA Y, KANNO E, ITOH T, FUKUDA M (2009). Varp is a novel Rab32/38-binding protein that regulates Tyrp1 trafficking in melanocytes. *Mol Biol Cell*, **20**(12), 2900-2908

TANG A, ELLER MS, HARA M, YAAR M, HIROHASHI S, GILCHREST BA (1994). E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci*, **107**, 983-992

TASSABEHJI M, NEWTON VE, READ AP (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet*, **8**, 251-255

TASSABHJI M, READ AP, NEWTON VE, HARRIS R, BALLING R, GRUSS P *et al.* (1992). Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*, **355**, 635-636

TASSABHJI M, READ AP, NEWTON VE, PATTON M, GRUSS P, HARRIS R *et al.* (1993). Mutations in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2. *Nat Genet*, **3**, 26-30

THEOS AC, TENZA D, MARTINA JA, HURBAIN I, PEDEN AA, SVIDERSKAYA EV *et al.* (2005a). Functions of AP-3 and AP-1 in Tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell*, **16**, 5356-5372

THEOS AC, TRUSCHEL ST, RAPOSO G, MARKS MS (2005b). The *silver* locus product Pmel 117/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res*, **18**(5), 322-336

TOMITA Y, SUZUKI T (2004). Genetics of pigmentary disorders. *Am J. Med. Genet. C Semin Med. Genet*, **131C**, 75-81

TSUCHIDA S, TAKIZAWA T, ABE K, OKAMOTO M, TAGAWA (2009). Identification of microphthalmia-associated transcription factor isoforms in dogs. *Vet J*, **182**, 283-293

- VALLEE RB, WALL JS, PASCHAL BM, SCHPETNER HS (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature*, **332**, 561-563
- VAN DEN BOSSCHE K, NAEYAERT JM, LAMBERT J (2006). The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic*, **7**(7), 769-778
- WADE N, BRYANT NJ, CONNOLLY LM, SIMPSON RJ, LUZIO JP, PIPER RC *et al.* (2001). Syntaxin 7 complexes with mouse Vps10p tail interactor 1b, Syntaxin 6, vesicle-associated membrane protein (VAMP)8, and VAMP7 in B16 melanoma cells. *J Biol Chem*, **276**, 19820-19827
- WAKAMATSU K, OHTARA K, ITO S (2009). Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzathiole structure. *Pigment Cell Melanoma Res*, **22**(4), 474-486
- WASMEIER C, HUME AN, BOLASCO G, SEABRA MC (2008). Melanosomes at a glance. *J Cell Sci*, **121**, 3995-3999
- WASMEIER C, ROMAO M, PLOWRIGHT L, BENNETT DC, RAPOSO G, SEABRA MC (2006). Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J Cell Biol*, **175**(2), 271-281
- WATANABE A, TAKEDA K, PLOPLIS B, TACHIBANA M (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat. Gene*, **18**, 283-286
- WEHRLE-HALLER B (2003). The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res*, **16**, 287-296
- WEI ML (2006). Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res*, **19**, 19-42
- WELLBROCK C, RANA S, PATERSON H, PICKERSGILL H, BRUMMELKAMP T, MARAIS R (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor Mitf. *PloS ONE*, **3**(7): e2734
- WESTBROEK W, LAMBERT J, NAEYEART JM (2001). The dilute locus and Griscelli syndrome : gateways towards a better understanding of melanosome transport. *Pigment Cell Res*, **14**, 320-327
- WU XS , MASEDUNSKAS A, WEIGERT R, COPELAND NG, JENKINS NA, HAMMER JA (2012). Melanoregulin regulates a shedding mechanism that drives melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**(31), E2101-2109
- XING J, GINTY DD, GREENBERG ME (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, **273**, 959-963
- XING J, KORNHAUSER JM, XIA Z, THIELE EA, GREENBERG ME (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal- regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **18**, 1946-1955
- YAMAGUCHI Y, BRENNER M, HEARING VJ (2007). The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem*, **282**, 27557-27561

YAMAGUCHI Y, ITAMI S, WATABE H, YASUMOTO K, ABDEL-MALEK ZA, ZUBO T *et al.* (2004). Mesenchymal-epithelial interactions in the skin :increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol*, **165**, 275-285

YAMAGUCHI Y, PASSERON T, HOASHI T, WATABE H, ROUZAUD F, YASUMOTO K *et al.* (2008). Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/ β -catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J*, **22**, 1009-1020

YASUMOTO K, WATABE H, VALENCIA JC, KUSHIMOTO T, KOBAYASHI T, APPELLA E *et al.* (2004). Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J Biol Chem*, **279**, 28330-28338

YASUMOTO K, YOKOYAMA K, SHIBATA K, TOMITA Y, SHIBAHARA S (1994). Microphthalmia associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 8058-8070

YASUMOTO K, YOKOYAMA K, TAKASHI 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**, 503-509

YOUNG A, POWELSON EB, WHITNEY IE, RAVEN MA, NUSINOWITZ S, JIANG M *et al.* (2008). Involvement of OA1, an intracellular GPCR, and G alpha i3, its binding protein, in melanosomal biogenesis and optic pathway formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **49**, 3245-3252

ZHANG Q, ZHEN L, LI W, NOVAK EK, COLLINSON LM, JANG EK *et al.* (2002). Cell-specific abnormal prenylation of Rab proteins in platelets and melanocytes of the gunmetal mouse. *Br J Haematol*, **117**(2), 414-423

ANALYSE PHÉNOTYPIQUE ET GÉNÉTIQUE DES COULEURS CARAMEL ET ABRICOT CHEZ LE CHAT

NOM et Prénom : BONVARLET Florence

Résumé

Les couleurs caramel et abricot du chat domestique seraient sous la dépendance d'un locus appelé *Dilute modifier (Dm)*, qui transformerait les robes diluées (exclusivement), soit les robes bleue, lilas et faon, en une couleur appelée « caramel » ; et la robe crème en une couleur appelée « abricot ». Officiellement mentionnées pour la première fois en Angleterre dans les années 1970, ces robes sont depuis l'objet d'une controverse au sein des fédérations félines internationales, le gène et la mutation se trouvant au locus *Dm* n'étant à ce jour pas encore identifiés, ni même le locus *Dm* cartographié. Nous avons recruté une cohorte de chats caramel et abricot, ainsi que des chats dilués contrôles, issus de chatteries françaises, anglaises, allemandes, polonaises et néerlandaises. A l'aide d'une étude généalogique et statistique, nous avons mis en évidence le mode de transmission des couleurs caramel et abricot, qui est très probablement autosomique dominant à expressivité variable. Nous avons ensuite sélectionné un gène candidat pour le locus *Dm* félin, à partir des données disponibles chez la souris : le gène *MREG* qui code la mélanoréguline et est impliqué dans le phénotype *Dilute suppressor* de la souris. Suite au séquençage de la phase codante de ce gène chez plusieurs chats caramel et dilués contrôles, et à une étude d'association à l'aide de marqueurs SNP (*single nucleotide polymorphism*), nous avons montré que la mutation responsable des couleurs caramel et abricot ne se situait pas dans le gène codant la mélanoréguline. Enfin, des observations de poils de chats caramel, abricot, bleu et crème en microscopie photonique et électronique à transmission nous ont permis de mettre en évidence des différences structurales entre les poils caramel et abricot, d'une part, et les poils bleu et crème, d'autre part.

Mots clés : GENETIQUE / ADN / COULEUR / POIL / ROBE DILUEE / DILUTION/
DILUTE MODIFIER / CARNIVORE / CHAT

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr Marie ABITBOL

Assesseur : Pr Philippe BOSSE

PHENOTYPIC AND GENETIC ANALYSIS OF THE FELINE CARAMEL AND APRICOT COAT COLOURS

SURNAME and given name: BONVARLET Florence

Summary

The feline caramel and apricot coat colours are suspected to be governed by a *Dilute modifier* (*Dm*) allele, that modify the diluted blue, lilac and fawn coat colours to caramel and modify the cream coat colour to apricot. First observed in Great Britain in the 1970's, these colours are the subject of controversy in international cats federations because no scientific evidence for the molecular basis of *dilute modifier* has been published so far. We have recruited a cohort of caramel, apricot and diluted control cats from French, English, German, Polish and Dutch catteries. We have confirmed the suspected inheritance pattern of caramel and apricot which is autosomal dominant with a variable expressivity. We have sequenced a candidate gene : *MREG*, that encodes melanoregulin and is involved in a similar phenotype in the mouse, called *Dilute suppressor*. We have not found any causative mutation in caramel and apricot cats compared to diluted cats. Additionally, an association study performed using SNP markers helped us to demonstrate that the caramel and apricot underlying mutation does not lie in the melanoregulin gene. Finally, microscopic observations of caramel, apricot, blue and cream hairs allowed us to suspect that structural differences between caramel and apricot, and blue and cream hairs exist.

Keywords: GENETICS / DNA / CAT / COLOUR / HAIR / DILUTE / DILUTION / DILUTE MODIFIER / CARNIVORE / CAT

Jury :

President : Pr.

Director : Dr Marie ABITBOL

Assessor : Pr Philippe BOSSE