

## Gènes de la coloration des races bovines allaitantes françaises. Perspective d'application à l'identification des produits

F. ROUZAUD (1), A. OULMOUDEN (1), J.M. PETIT (1), H. LEVEZIEL (2), R. JULIEN (1)

(1) Biotechnologie, Faculté des Sciences, 87060 Limoges Cedex

(2) INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex

**RÉSUMÉ** – La couleur de la robe des bovins résulte pour l'essentiel des interactions s'établissant entre les allèles de cinq gènes. L'un d'entre eux, le gène *extension* code un récepteur membranaire du mélanocyte, long de 317 acides aminés, qui peut lier l'hormone  $\alpha$ -MSH (couleur brun/noir) ou la protéine agouti (couleur rouge/jaune). Nous avons réalisé le clonage et le séquençage du gène *extension* chez six races françaises allaitantes. Les races Aubrac, Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine et Salers possèdent en commun un récepteur tronqué (155 acides aminés) dû à la délétion de la guanine en position 310. En revanche, la race Gasconne possède un récepteur normal de 317 acides aminés. Basé sur ces informations, un test d'identification des produits carnés issus d'animaux possédant ou non la délétion G310 peut être mis en œuvre. La poursuite des études sur les autres gènes de la coloration aboutira à la définition d'un profil génétique spécifique de chaque race bovine.

## Coat-color genes of French cattle breeds. A way for cattle products identification

F. ROUZAUD (1), A. OULMOUDEN, J.M. PETIT, H. LEVEZIEL, R. JULIEN

(1) Biotechnologie, Faculté des Sciences, 87060 Limoges Cedex

**SUMMARY** – The bovine coat color depends mainly on five genes. Among them, *extension* encodes a peptide of 317 amino-acids found on the membrane of melanocyte, which binds two ligands, the hormone  $\alpha$ -MSH (brown/black coloration) and agouti (red/yellow coloration). We have cloned and sequenced *extension* from six French cattle breeds and established that Aubrac, Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine and Salers possess a truncated receptor (155 aa) due to a deletion of guanine at position 310. The Gasconne breed have a normal receptor. Studies on the others coat-color genes could allow the definition of a genetic profile specific of each cattle breed.

## INTRODUCTION

La couleur de la robe est un critère souvent retenu pour définir les races bovines.

Avec la volonté des professionnels de s'assurer une maîtrise accrue du devenir des produits issus de l'élevage, la connaissance fine des gènes responsables de la pigmentation peut constituer un moyen efficace de caractérisation des races et de contrôle des produits. Puisque la couleur de la robe des bovins résulte pour l'essentiel des interactions s'établissant entre les allèles de quelques gènes, la connaissance de la séquence de chacun d'eux peut fournir les signatures authentifiant les produits carnés de chaque race.

La génétique classique distingue au moins 5 gènes principaux de coloration de la robe des mammifères : le gène *A* (*agouti*) qui définit le phénotype sauvage, dit aussi agouti, le gène *C* (tyrosinase) qui permet l'expression de la coloration, son allèle *c* l'empêchant (albinisme), le gène *D* (*dilution*) qui contrôle l'intensité de la pigmentation, le gène *E* (*extension*) qui contrôle la balance entre l'eumélanine (pigment noir/brun) et la phaeomélanine (pigment rouge/jaune), le gène *S* (*spotting*) qui contrôle la présence ou l'absence des taches des phénotypes « pie ».

Grâce aux progrès accomplis par la biochimie et la génétique moléculaire, les produits protéiques résultant de l'expression de ces gènes commencent à être connus (Tableau 1) avec pour conséquence un début de compréhension du « puzzle » des mécanismes moléculaires responsables de la coloration.

Tableau 1 : Principaux gènes de la pigmentation

Symbole	Produit	Phénotype normal	Phénotype mutant
C	enzyme de synthèse des mélanines	pigmenté	albinos
A	protéine Agouti soluble, ligand du récepteur MC1	pigmenté série rouge/jaune	pigmenté noir
E	protéine récepteur MC1 de la membrane du mélanocyte	pigmenté série noire/brun	pigmenté série rouge/jaune
S	protéine récepteur de la membrane du mélanocyte réglant sa migration cellulaire	non-pie	pie

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un récepteur protéique long de 317 acides aminés, présent dans la membrane du mélanocyte (Fig. 1A), et codé par le gène *E*, cloné et séquencé par Vanetti *et al.* (1994), peut lier l'hormone peptidique  $\alpha$ -MSH et/ou la protéine agouti (Lu *et al.*, 1994). Lorsque le récepteur est occupé par l'hormone, il transmet, grâce à un changement de conformation, un signal à une protéine G hétérotrimérique (composée des sous-unités

$\alpha\beta\gamma$ ) qui à son tour stimule l'activité d'une enzyme membranaire, l'adénylate cyclase. Il en résulte une synthèse d'AMP cyclique, dont la concentration plus ou moins élevée influera à son tour sur la synthèse de la tyrosinase (gène *C*). Une activité élevée de la tyrosinase (Fig. 2) conduira à la synthèse préférentielle de l'eumélanine (pigment noir/brun) alors qu'une activité plus faible orientera la voie métabolique vers la synthèse de la phaeomélanine (pigment rouge/jaune). On notera le rôle tout particulier de la protéine GRK (Prémont *et al.*, 1995) qui peut phosphoryler certains acides aminés (sérine et/ou thréonine) de la région C-terminale du récepteur et, par voie de conséquence, interrompre la transmission du signal (désensibilisation du récepteur).

Un mutant du gène *E*, l'allèle *e* récessif découvert par Klun- gland *et al.* (1995), porteur d'une délétion (Fig. 3) en position 310 (élimination d'une base guanine), conduit à la synthèse d'un récepteur raccourci à 155 acides aminés, qui perd de ce fait la capacité de lier l'hormone  $\alpha$ -MSH, tout en conservant cependant celle de lier la protéine agouti (Fig. 1B). L'extrémité C-terminale de ce récepteur particulier est hautement phosphorylable (interruption du signal), d'où il résulte une faible stimulation de l'adénylate cyclase, et finalement un faible niveau de synthèse et de concentration en AMPc. Dans ces conditions, c'est la voie de biosynthèse de la phaeomélanine rouge/jaune qui est privilégiée. A un récepteur court peut donc être associée la synthèse préférentielle du pigment rouge/jaune, alors qu'à un récepteur long est associée la synthèse préférentielle du pigment noir.

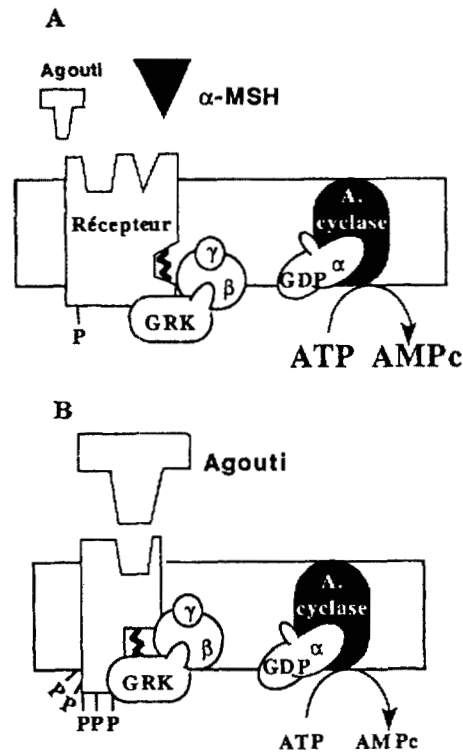
A la suite des travaux de Vanetti *et al.* (1994) et Klun- gland *et al.* (1995), nos laboratoire ont réalisé le clonage et le séquençage des allèles du gène *E* des 6 races françaises de bovins allaitants. Nous avons établi, après analyse de l'ADN de 5 individus pour chaque race, que l'allèle *e* récessif (porteur de la délétion G310) est présent chez les races Aubrac, Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine, Salers. La race Gasconne possède des allèles normaux *E* responsables de la coloration allant du blanc-gris au noir.

## CONCLUSION

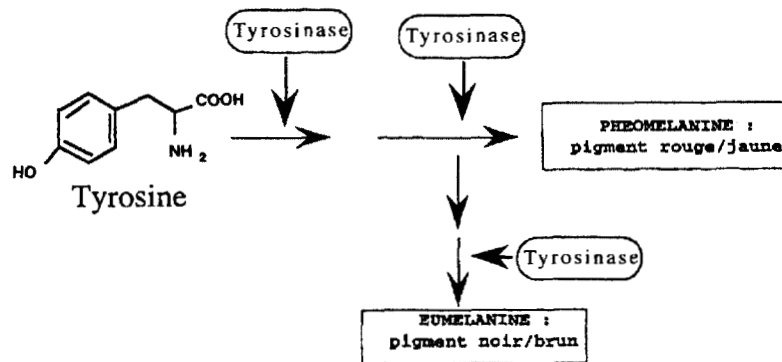
La connaissance de la délétion G310 conduit, comme pour les races rouge et noire norvégiennes (Klun- gland *et al.*, 1995), à la définition d'un test d'identification (Fig. 4) des produits carnés provenant d'animaux possédant un récepteur de longueur normale (série noire, ex : race Gasconne) ou un récepteur raccourci (série rouge, ex : races Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine, Salers). La démarche entreprise s'applique également aux autres gènes de coloration en particulier le gène *A* (*agouti*) intervenant dans la dilution des mélanines que notre laboratoire vient de cloner et de séquencer et le gène *S* responsable du caractère « pie ». L'identification des allèles des gènes de coloration conduira à un arbre de décision (Fig. 5) permettant d'établir par élimination successive l'origine d'un produit carné bovin. On observera que cette approche conduira également à définir un génotype de coloration pour chaque race.

## RÉFÉRENCES

- KLUNGLAND, H., VAGE, D.I., GOMEZ-RAYA, L., ADALSTEINSSON, S., LIEN, S., 1995. *Mammalian Genome*, 6, 636-639.
- LU, D., WILLARD, D., PATEL, I.R., KADWELL, S., OVERTON, L., KOST, T., LUTHER, M., CHEN, W., WOYCHIK, R.P., WILKISON, W.O., CONE, R.D., 1994. *Nature*, 371, 799-802.
- PREMONT, R.T., INGLESE, J., LEFROWITZ, R.J., 1995. *The FASEB Journal*, 9, 175-182.
- VANETTI, M., SCHÖNROCK, C., MEYERHOF, W., HÖLLT, V., 1994. *FEBS Letters*, 348, 268-272.



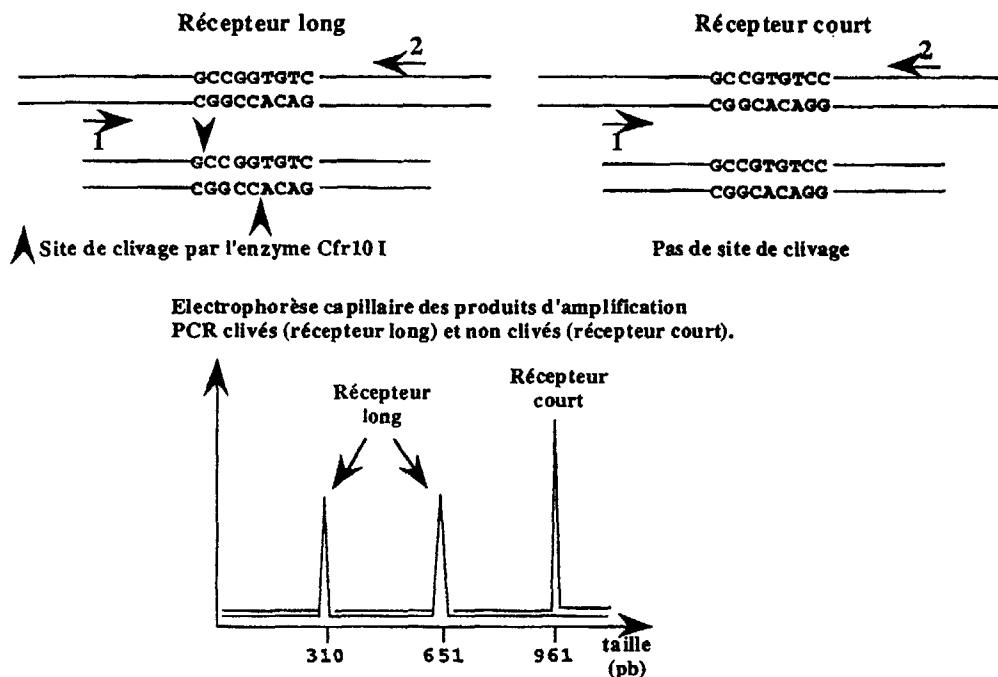
**Figure 1 :** Représentation schématique des composants membranaires du système de transduction du signal contrôlant la synthèse des mélanines. **A :** Récepteur long, ligands  $\alpha$ -MSH et Agouti (race bovine : série noire) ; **B :** récepteur court, ligand Agouti (race bovine ; série rouge). GRK : Kinase associée à un récepteur ; A. cyclase : adénylate cyclase ; GDP : guanosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  : sous unités de la protéine G ;  $\alpha$ -MSH : hormone stimulant les mélanocytes.



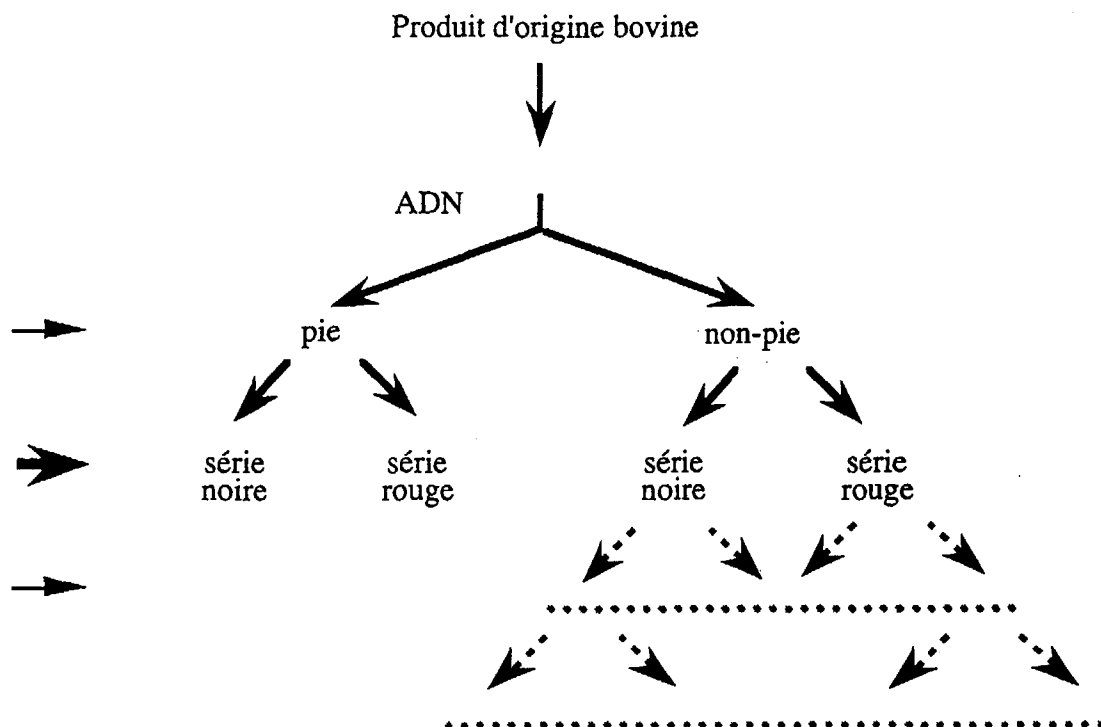
**Figure 2 :** Voie de synthèse des mélanines.

Allèle <i>E</i> (Gascon) :	<b>GAG</b>	<b>GCC</b>	<b>GGT</b>	<b>GTC</b>	<b>CTG</b>	<b>GCC</b>		
Allèle <i>e</i> (Limousin) :	---	---	-TG	TCC	TGG	CCA		
Allèle <i>E</i> (Gascon) :	<b>GVAL</b>	-	//-	<b>HLV</b>	---	//	--W	317
Allèle <i>e</i> (Limousin) :	<b>VSWP</b>	-	//-	<b>TVL</b>	155			

**Figure 3 :** Délétion ponctuelle d'une base G du gène *E* provoquant le raccourcissement de la séquence peptidique du récepteur des bovins limousins (mélanine rouge/jaune) comparativement à la séquence rencontrée chez les bovins gascons (mélanine noire).



**Figure 4 :** Principe de la détection de la délétion ponctuelle par la technique RFLP-PCR  
 Amorces utilisées pour la réaction PCR :  
 - Amorce 1 = 5' GACGATGCCTGCACTTGGCTCCCAGAGGCG 3'  
 - Amorce 2 = 5' CCCTCACCAGGAGCACTGCAGCACCTTTG 3'.



**Figure 5 :** Arbre de décision pour déterminer l'origine d'un produit carné bovin. Par amplification spécifique de l'ADN à partir d'amorces définies grâce aux connaissances acquises (→ typage possible du gène *E*) et aux travaux en cours (→ typage à l'étude des gènes *A*, *C* et *S*), il sera possible d'établir la population d'origine (race) d'une viande.