

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION.....	11
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. LE SYSTÈME TÉGUMENTAIRE	13
I.1 Structure de la peau	13
I.1.1 L'épiderme	13
I.1.2 Les poils	14
I.1.2.A Follicules pileux.....	14
I.1.2.A.a Structure des follicules pileux	14
I.1.2.A.b Croissance des poils	17
II. LE DEVELOPPEMENT DES MELANOCYTES EPIDERMiques ET MELANOCYTES FOLLICULAIRES	19
I.2 Biogenèse du mélanosome	23
I.3 Le transport des mélanosomes	26
I.4 Régulation de la pigmentation pileaire	27
I.5 Bilan	29
III. DETERMINISME DES COULEURS DE ROBE CHEZ LES CHEVAUX.....	30
I.1 Robes de bases	30
I.1.1 Le locus <i>Extension</i>	30
I.1.2 Le locus <i>Agouti</i>	30
I.1.3 La robe « Alezan »	32
I.1.4 La robe « Bai »	33
I.1.5 La robe « Noir »	34
I.2 Robes de bases modifiées.....	35

I.2.1	Dilution de la couleur de base	35
I.2.1.A	Dilution crème : le locus <i>Cr</i> (<i>Cream</i>), gène <i>MATP</i> (<i>SLC45A2</i>)	35
I.2.1.B	Dilution <i>Pearl</i> : le locus <i>Prl</i> (<i>Pearl</i> ou <i>Perle</i>)	36
I.2.1.C	Dilution Silver : le locus <i>Z</i> (<i>Silver</i>), le gène <i>PMEL17</i>	37
I.2.1.D	Dilution Champagne : le locus <i>Ch</i> (<i>Champagne</i>), gène <i>SLC36A1</i>	38
I.2.1.E	Dilution Dun : le locus <i>D</i> (<i>Dun</i>)	39
I.2.2	Modification de la couleur de base	40
I.2.2.A	Grisonnement : le locus <i>G</i> (<i>Greying</i>)	41
I.2.2.B	Rouan : le locus <i>Rn</i> (<i>Roan</i>)	41
I.2.3	Patrons	42
I.2.3.A	Patron Pangaré, le locus <i>P</i> (<i>Pangaré</i>)	43
I.2.3.B	Autres patrons identifiés	44
I.3	Autres robes mal caractérisées	45
IV.	LES COULEURS ET TEXTURES DE ROBES CHEZ LES ANES DOMESTIQUES.....	46
DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE		53
I.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	53
I.1	Animaux	53
I.2	Étude génétique	57
I.2.1	Sélection des gènes candidats	57
I.2.2	Extraction d'acides nucléiques.....	58
I.2.2.A	ADN à partir de sang	58
I.2.2.B	ADN à partir de brossettes buccales	58
I.2.2.C	ADN à partir de follicules pileux.....	58
I.2.2.D	ARN à partir de biopsies de peau	58
I.2.3	PCR (Polymérase Chain Reaction)	59
I.2.3.A	Dessin des amorces de PCR.....	59
I.2.3.B	Réaction de PCR	59
I.2.4	Purification	62
I.2.5	RT-PCR.....	63
I.2.6	Séquençage.....	63
I.2.7	Génotypage de SNP par pyroséquençage.....	63
I.2.8	Logiciels utilisés.....	64

II.	RÉSULTATS	65
I.1	Gènes candidats retenus	65
I.1.1	Gènes candidats pour Noir/Bai/Chocolat.....	65
I.1.2	Gènes candidats pour la robe Grise.....	67
I.1.3	Gènes candidats pour le poil du Baudet du Poitou.....	72
I.2	Méthodologie d'analyse des séquences.....	75
I.2.1	Gènes candidats pour la couleur de robe Noir/Bai.....	77
I.2.1.A	<i>ASIP</i>	77
I.2.1.B	<i>MC1R</i>	79
I.2.1.C	<i>TYRP1</i>	80
I.2.1.D	<i>DCT</i> ou <i>TYRP2</i>	83
I.2.1.E	<i>BD103</i> (β -Défensine).....	84
I.2.2	Gènes candidats pour la couleur de robe Grise	85
I.2.2.A	<i>PMEL17</i>	85
I.2.2.B	<i>RAB27</i>	88
I.2.2.C	<i>KITL</i>	89
I.2.2.D	<i>VPS33a</i> (candidat <i>Dun</i>).....	90
I.2.2.E	<i>MLPH</i>	91
I.2.2.F	<i>TYR</i>	93
I.2.3	Gènes candidats pour les poils longs.....	94
I.2.3.A	<i>FGF5</i>	94
III.	DISCUSSION	99
	CONCLUSION	106
	BIBLIOGRAPHIE	108
	ANNEXES	116

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du poil	15
Figure 2: Coupe longitudinale de poil en phase anagène.....	16
Figure 3: Coupe transversale de la gaine d'un poil.....	17
Figure 4: Le cycle pileux (d'après Fuchs <i>et al.</i> , 2001)	18
Figure 5: Le cycle pileux (d'après (Scott et Miller, 2011)	18
Figure 6: Répartition des mélanoblastes dans des embryons de souris à différents stades de développement embryonnaire.....	19
Figure 7: L'unité mélano-épidermique	20
Figure 8: Un mélanocyte isolés observé en microscopie optique	21
Figure 9: Biogénèse des mélanosomes.....	23
Figure 10: Biosynthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine faisant intervenir les enzymes Tyrosinase, TYRP1 et TYRP2, à l'intérieur des mélanosomes.....	24
Figure 11: Schéma de la biogénèse des mélanosomes montrant les lieu d'intervention des différentes protéines d'adressage.	25
Figure 12: Génotypes de souris mutées pour <i>Rab27</i> et <i>Myo5a</i>	26
Figure 13: Phénotype <i>leaden Mlph^{ln}/Mlph^{ln}</i>	26
Figure 14: La capture et le transport des mélanosomes est sous le contrôle de trois protéines : MYO5a, MLPH et RAB27a	27
Figure 15: Le phénotype agouti est sous contrôle du récepteur membranaire MC1R et des protéines Agouti et alpha-MSH.....	28
Figure 16 : Schéma récapitulatif de la biogénèse des mélanosomes.....	29
Figure 17: Mécanismes moléculaires de la production des mélanines foncées (eumélanine) et claires (phéomélanine) grâce aux protéines ASIP et MC1R.....	31
Figure 18: Génotype et phénotype de la robe Alezan chez le cheval	32
Figure 19: Génotype et phénotype de la robe Bai chez le cheval	33
Figure 20:Génotype et phénotype de la robe Noir chez le cheval	34
Figure 21: Palomino : <i>e/e CR/cr</i>	34
Figure 22: Cremello : <i>e/e CR/CR</i>	35
Figure 23: Isabelle : <i>E/- A/- CR/cr</i>	35
Figure 24: Perlino : <i>E/- A/- CR/CR</i>	36
Figure 25: Smoky black : <i>E/- a/a CR/cr</i>	35
Figure 26: Smoky cream : <i>E/- a/a CR/CR</i>	35
Figure 27: Alezan Pearl : <i>e/e prl/prl</i>	37
Figure 28: Bai Silver : <i>E/- /-a Z/-</i>	37
Figure 29: Noir Silver <i>E/- a/a Z/-</i>	37
Figure 30: Champagne Or <i>e/e A/- CH/-</i>	38
Figure 31: Champagne Ambre <i>E/- A/- CH/-</i>	39
Figure 32: Champagne classique <i>E/- a/a CH/-</i>	39
Figure 33: Cheval de Przewalski: extrémités sombres, présence de zébrures	40
Figure 34: Cheval Noir Dun.....	40
Figure 35: Jument grise avec son poulain pigmenté.	41
Figure 36: Poulain en cours de grisonnement.	41
Figure 37: Alezan rouan, ou alezan granité/mélangé, appelé aussi robe aubère.....	42
Figure 38: Bai rouan.....	42
Figure 39: Noir rouan ou noir mélangé/granité.....	42

Figure 40: Bai pangaré : décoloration blanche du ventre, du museau, de l'intérieur des membres et du contour des yeux.	43
Figure 41: Noir pangaré, décoloration rousse du ventre, du museau, de l'intérieur des membres et du contour des yeux.	44
Figure 42: Exemples de panachure blanche chez le cheval	44
Figure 43: Robe <i>flaxen</i> ou crins lavés	44
Figure 44: Robe bringée.....	45
Figure 45: Appellations des couleurs au sein des différentes races françaises	47
Figure 46: Variation de couleurs au sein des ânes Normands.....	47
Figure 47: Variation de texture et de couleur au sein des baudets du Poitou	48
Figure 48: Ane bouchard (non pangaré)	49
Figure 49: Organisation génomique du gène ASIP chez le Lapin	65
Figure 50: Photographie d'une souris non agouti (<i>a/a</i>), brown (<i>b/b</i> au locus <i>Tyrp1</i>) et slaty (<i>slt/slt</i> au locus <i>Dct</i>).....	66
Figure 51: Génotype de trois chiens : fauve, sable et noir.....	67
Figure 52: Souris mutantes au locus <i>PMEL</i>	68
Figure 53: Effet de dilution de <i>PMEL</i> chez les bovins	68
Figure 54: Poils d'ânes vus au microscope optique (x40).....	69
Figure 55: Photographie d'une souris <i>underwhite Slc45a2^{Uw}/Slc45a2^{Uw}</i>	70
Figure 56: Souris mutantes au locus <i>Rab38</i>	70
Figure 57: Hypopigmentation du mutant au locus <i>buff</i>).	71
Figure 58: Phénotypes de pelage observés chez le chien en fonction des différents allèles à chacun des trois gènes <i>FGF5</i> , <i>RSPO2</i> et <i>KRT71</i> impliqués.....	73
Figure 59 : Présence d'un double pic avec hétérozygotie A/G en position 324.....	75
Figure 60: Décalage suite à une délétion en position 142 chez un animal hétérozygote entraînant des doubles pics par la suite.	76
Figure 61: Alignement de séquences. Les séquences identiques à 90% apparaissent en rouge, celles où la concordance est comprise entre 50 et 90% en bleu, les autres en noir.	76
Figure 62: Comparaison et l'homologie des séquences entre le cheval, le chien, le porc et la vache pour la partie 5'UTR du gène ASIP.....	78
Figure 63: Etude d'expression d'ASIP en RT-PCR	79
Figure 64: Prédiction des effets du SNP du gène <i>MC1R</i>	80
Figure 65 : Prédiction des effets des 3 SNP de l'exon 1 du gène <i>TYRP1</i>	82
Figure 66 : Etude d'expression de <i>TYRP1</i> en RT-PCR.....	83
Figure 67: Etude par Polyphen de deux mutations de l'exon 2 du gène <i>PMEL17</i>	86
Figure 68: Etude par Polyphen de la mutation de l'exon 11 du gène <i>PMEL17</i>	87
Figure 69: Alignement de la séquence partielle de l'exon 2 du gène <i>FGF5</i> , montrant une délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 du gène <i>FGF5</i> chez certains ânes	94
Figure 70: Décalage du cadre de lecture et codon stop prématuré dans la transcription de <i>FGF5</i> chez les baudets du Poitou.....	97
Figure 71: Disparité des définitions pour les robes des ânes Normands.....	99
Figure 72: Terminologie proposée pour les ânes Normands.....	103
Figure 73: Terminologie proposée pour les Baudets du Poitou.....	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tableau des différents génotypes possibles en fonction des phénotypes des robes de base.	34
Tableau 2: Effets de la dilution Crème sur les robes de base.....	35
Tableau 3: Effets de la dilution Perle sur les robes de base.....	37
Tableau 4: Effets de la dilution Silver sur les robes de base.....	38
Tableau 5: Effets de la dilution Champagne sur les robes de base.....	39
Tableau 6: Effets de la dilution Dun sur les robes de base.....	40
Tableau 7: Descriptions des couleurs de robe et texture du pelage des cinq races asines françaises sujet de cette étude (d'après les standards des races).....	50
Tableau 8: Nombre d'animaux initialement prévus dans le projet.....	53
Tableau 9: Nombre d'animaux inclus dans l'étude au 01/09/2012.....	53
Tableau 10: Ensemble des animaux inclus dans l'étude.....	54
Tableau 11: Volumes utilisés pour les protocoles de PCR.....	59
Tableau 12: Températures et amorces utilisées dans les réactions de PCR et le séquençage des exons.....	60
Tableau 13: Températures et amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR.....	63
Tableau 14: Gènes candidats retenus pour l'étude.....	73
Tableau 15: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>ASIP</i> chez les ânes.....	77
Tableau 16: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>MC1R</i> chez les ânes.....	79
Tableau 17: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>TYRP1</i> chez les ânes.....	80
Tableau 18: Génotypes pour les trois SNP non synonymes de l'exon 1 du gène <i>TYRP1</i>	81
Tableau 19 : Génotypes pour le SNP situé dans le 3'UTR du gène <i>TYRP1</i>	82
Tableau 20 : Variations de séquence identifiées dans le gène <i>DCT</i> chez les ânes.....	83
Tableau 21 : Variations de séquence identifiées dans le gène de la <i>beta-defensin 103</i> chez les ânes.....	84
Tableau 22: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>PMEL17</i> chez les ânes.....	85
Tableau 23: Génotypes pour les trois SNP de l'exon 2 du gène <i>PMEL17</i>	86
Tableau 24: Génotypes pour les variations de séquence de l'intron 10 et de l'exon 11 du gène <i>PMEL17</i>	87
Tableau 25: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>RAB27</i> chez les ânes.....	88
Tableau 26: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>KITL</i> chez les ânes.....	89
Tableau 27: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>VPS33a</i> chez les ânes.....	90
Tableau 28: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>MLPH</i> chez les ânes.....	91
Tableau 29: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>TYR</i> chez les ânes.....	93
Tableau 30: Variations de séquence identifiées dans le gène <i>FGF5</i> chez les ânes.....	94
Tableau 31: Génotypes des six ânes et du cheval initialement séquencés, pour la délétion de 2pb située dans l'exon 2 du gène <i>FGF5</i>	95
Tableau 32: Répartition des génotypes pour la délétion de 2pb située dans l'exon 2 du gène <i>FGF5</i> chez un panel d'ânes, de chevaux et de poneys de différentes races.....	96

ABRÉVIATIONS

α -MSH: *α -Melanocyte Stimulating Hormone*
3'UTR : 3' *UnTranslated Region*
5'UTR : 5' *UnTranslated Region*
aa : acides aminés
A : Adénine
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1 et 3 : *Adaptor Protein-1 et 3*
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASIP : *Agouti Signaling Protein*
BLOC: *Biogenesis of Lysosome related Organelles*
C: Cytosine
CBD103: *Beta-defensin 103*
Ch: Champagne
Cr: *Cream*, Crème
D: Dun
DCT : Dopachrome Tautomérase (=TYRP2)
Del: Délétion
DHI : 5, 6-dihydroxyindole
DHICA : *5, 6-dihydroxylindole-2- carboxylic acid*
DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine
FGF : *Fibroblast Growth Factor* = facteur de croissance fibroblastique
G : Guanine
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate
GFE : Gaine Folliculaire Externe
GFI : Gaine Folliculaire Interne
HPS : *Hermansky-Pudlak syndrome*
INAM : Institut National Anes et Mulets
Kb : Kilobases
Kitl : *Kit Ligand*
Krt71: Keratine-71
LacZ : gène rapporteur codant la bêta-galactosidase
Lyst : *Lysosomal Trafficking Regulator*
MATP: *Membrane-associated transporter protein (=Slc45a2)*
MC1R : *Melanocortin Receptor 1*, Récepteur 1 aux Mélanocortines
MITF : *MIcrophthalmia-associated Transcription Factor*
MLPH : Mélanophiline
MREG : Mélanoréguline
MYO5A : *Myosin-Va*
P : Pangaré
pb : paire de bases
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
Prl : *Pearl*, Perle

PMEL17 : *Premelanosomal Protein 17*
Rab27a : *Ras-related protein 27*
RSPO2 : *R-spondin-2*
RT-PCR : *Reverse transcription-PCR*
RT-qPCR : *Reverse transcription-quantitative-PCR*
Slc45a2 : *Solute carrier family 45 (=MATP)*
SNP : *Single-Nucleotide Polymorphism*, Polymorphisme d'un seul nucléotide
T : *Thymine*
TGN : *réseau trans-Golgi*
TYR : *Tyrosinase*
TYRP1 : *Tyrosinase Related Protein 1*
TYRP2 : *Tyrosinase Related Protein 2 (=DCT)*
USA: *United States of America*, Etats Unis d'Amérique
VPS33a : *Vacuolar protein sorting-associated protein 33A*
Z : *Silver*

INTRODUCTION

Domestiquée en Afrique il y a près de 5000 ans (Beja-Pereira *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2011) et façonnée par les besoins humains durant des siècles, la population asine a connu au XX^{ème} siècle une forte décroissance avec l'avènement des machines à moteur, les races françaises ayant même failli disparaître. Il ne restait en 1977 que 44 Baudets du Poitou, seule race alors officiellement reconnue (source : Haras-Nationaux). Grâce à l'implication de passionnés, des programmes de conservation et la reconnaissance des autres races d'ânes français par les haras nationaux et le ministère de l'agriculture ont vu le jour et ont permis un regain d'intérêt pour l'espèce asine dont on recense désormais plus de 60 000 individus sur le territoire.

A partir des années 2000 chez le cheval, à la suite des travaux effectués dans les années 1990 chez la souris, de nombreuses publications ont révélé les gènes responsables des différentes couleurs de robes et les analogies existantes entre mammifères. Le même gène appelé *ASIP* (*Agouti Signaling Protein*) est par exemple responsable de la couleur noire chez le cheval, la souris, un petit nombre de races canines, le lapin ou encore le mouton. A ce jour, aucune étude n'avait encore été menée dans l'espèce asine afin d'identifier le déterminisme moléculaire de la couleur de la robe.

De plus, aucun vocabulaire fixé n'existe en France pour décrire les robes présentes dans l'espèce asine et la même robe est tantôt nommée bai, bai foncé, chocolat voir noir pangaré suivant la terminologie utilisée chez le cheval, terminologie pas toujours adaptée aux robes asines.

Notre étude visait à établir les bases génétiques des différentes couleurs observées dans six races asines françaises, bases qui permettraient d'objectiver les différentes robes et de proposer une nouvelle terminologie adaptée à l'âne.

Dans une première partie, nous étudierons tout d'abord la structure de la peau et du poil et les cellules responsables de la couleur, puis nous verrons les mécanismes biologiques à l'origine des différentes couleurs, ce qui nous permettra de détailler les étapes et les acteurs clés de la synthèse, du transport et du transfert des pigments. Enfin, nous ferons une synthèse des travaux menés chez le cheval et ayant permis de mettre en évidence les gènes impliqués dans la couleur et les motifs des principales robes.

Dans une seconde partie nous présenterons notre travail expérimental qui a consisté tout d'abord à sélectionner des gènes candidats à partir de la littérature existante chez le cheval et d'autres espèces de mammifères afin, dans un second temps de rechercher les mutations responsables des trois robes principales rencontrées chez les ânes (Noir, Bai, Gris) et du phénotype poil long.

I.

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SYSTÈME TÉGUMENTAIRE (Miller *et al.*, 2012; Scott et

Miller, 2011)

La peau est l'organe le plus grand et le plus visible du corps et la barrière anatomique et physiologique entre l'animal et son environnement. Elle procure une protection contre les attaques physiques, chimiques et microbiologiques et ses capteurs sensoriels perçoivent la chaleur, le froid, la douleur, le contact et la pression.

La pigmentation cutanée et des poils se déroule au sein du système tégumentaire qui regroupe la peau et ses structures annexes : les poils, les ongles, les glandes sudoripares et sébacées, les muscles arrecteurs du poil, des nerfs permettant la sensibilité cutanée et les vaisseaux du derme qui permettent le soutien nutritionnel de l'épiderme (Knottenbelt *et al.*, 2009).

I.1 Structure de la peau

Sur le plan structural, la peau comprend deux parties principales. La partie superficielle, la plus mince, appelée épiderme, se compose d'un tissu épithélial. Il mesure en général entre 30 à 95 micromètres (moyenne de 53µm) (Bensignor *et al.*, 2004; Scott et Miller, 2011) et est plus épais dans les zones glabres. La partie la plus profonde nommée derme est plus épaisse et se compose de tissu conjonctif. L'épiderme et le derme sont solidement liés par une membrane basale complexe. En dessous du derme se trouve la couche sous-cutanée, qui n'appartient pas à la peau à proprement parler. Elle est appelée fascia superficiel ou encore hypoderme. C'est dans l'hypoderme que l'on trouve le tissu adipeux ainsi que les vaisseaux sanguins à l'origine de l'irrigation de la peau.

I.1.1 L'épiderme

L'épiderme est composé majoritairement de quatre types de populations cellulaires : les kératinocytes (environ 85% de cellules épidermiques), les mélanocytes (environ 5%), les cellules de Merkel (2%) et les cellules de Langerhans (3-8%). Il est divisé en différentes couches bien différenciées au fur et à mesure de l'évolution des cellules venant de la couche basale. De la plus interne à la plus externe on trouve : la couche basale ou *stratum basale*, la couche épineuse ou *stratum spinosum*, la couche granuleuse ou *stratum granulosum*, la couche claire ou *stratum lucidum* (qui semble absente chez les chevaux (Scott et Miller, 2011) et la couche cornée ou *stratum corneum*.

Les cellules responsables de la pigmentation de la peau sont les mélanocytes qui produisent des pigments appelés mélanines. Ces cellules sont présentes essentiellement dans la couche

basale mais on en trouve également dans la matrice des follicules pileux, dans la gaine folliculaire externe ainsi que dans les conduits des glandes sébacées et sudoripares. Les mélanines y sont produites et stockées au sein d'organites appelées mélanosomes. Dans la couche basale, chaque mélanocyte établit le contact avec 2 à 20 kératinocytes voisins (Scott, 2004) auxquels il transfère les mélanosomes via ses dendrites. Tous les individus ont le même nombre de mélanocytes pour une zone donnée et les différences de couleur qui s'observent sont dues à l'activité mélanogénique des mélanocytes plus qu'à leur nombre. L'origine embryonnaire des mélanocytes ainsi que la biogenèse des mélanosomes seront vus par la suite.

La population mélanocytaire est scindée en deux groupes, on distingue les mélanocytes épidermiques et les mélanocytes folliculaires, les deux systèmes étant anatomiquement et fonctionnellement indépendants. De plus, la mélanogénèse dans l'épiderme est continue alors qu'elle est fonction du rythme pileux dans le follicule.

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

I.1.2 Les poils

I.1.2.A Follicules pileux

Les poils sont une particularité des mammifères chez qui ils jouent un triple rôle, d'abord dans la régulation thermique de l'animal, en fonction de leur couleur, de leur densité, de leur longueur et de leur épaisseur, mais aussi dans la perception de leur environnement et dans la protection contre les attaques physiques et chimiques. Le nombre de follicules pileux (et donc de poils auxquels ils donnent naissance) est acquis dès la naissance. On en compte deux à 3000 par cm² et il n'y a pas de création de follicules pileux au cours de la vie de l'animal (Scott et Miller, 2011).

I.1.2.A.a Structure des follicules pileux

Chaque follicule pileux est associé à un seul poil, à un muscle arrecteur, à une glande sébacée et plusieurs glandes sudoripares comme le montre la Figure 1. Il s'insère dans le derme obliquement par invagination de l'épiderme. Les principales parties du poil sont la tige, partie visible à la surface du tégument, et la racine, partie invisible enchâssée dans le derme dont l'extrémité en cupule (le bulbe pileux) reçoit la papille vasculaire nourricière appelée papille dermique. Le bulbe pileux est entouré d'un enchevêtrement de terminaisons nerveuses sensibles s'enroulant autour de chaque follicule et appelées plexus de la racine du poil. Les poils sont donc également des récepteurs sensoriels du toucher. La papille dermique est quant à elle composée de tissu dermique et est vascularisée par des capillaires qui apportent aux cellules du follicule pileux les nutriments essentiels à sa croissance. Le poil comporte aussi des annexes : une glande sébacée et le muscle arrecteur.

En coupe longitudinale on peut noter quatre zones. A la base du poil se trouve le bulbe avec la papille dermique qui vascularise et innerve le follicule. Au-dessus se trouve la matrice où les kératinocytes se divisent et donnent des cornéocytes qui permettent par ajout de « briques » successives à la base du poil la croissance de celui-ci (Figure 2). Vient ensuite le renflement où s'insère le muscle arrecteur du poil. Puis on trouve l'isthme délimité par l'insertion du muscle arrecteur du poil et le conduit de la glande sébacée et enfin l'*infundibulum* qui est la partie la plus superficielle (Miller *et al.*, 2012; Scott et Miller, 2011).

Figure 1: Structure du poil (Geras et Greaves, 1990).

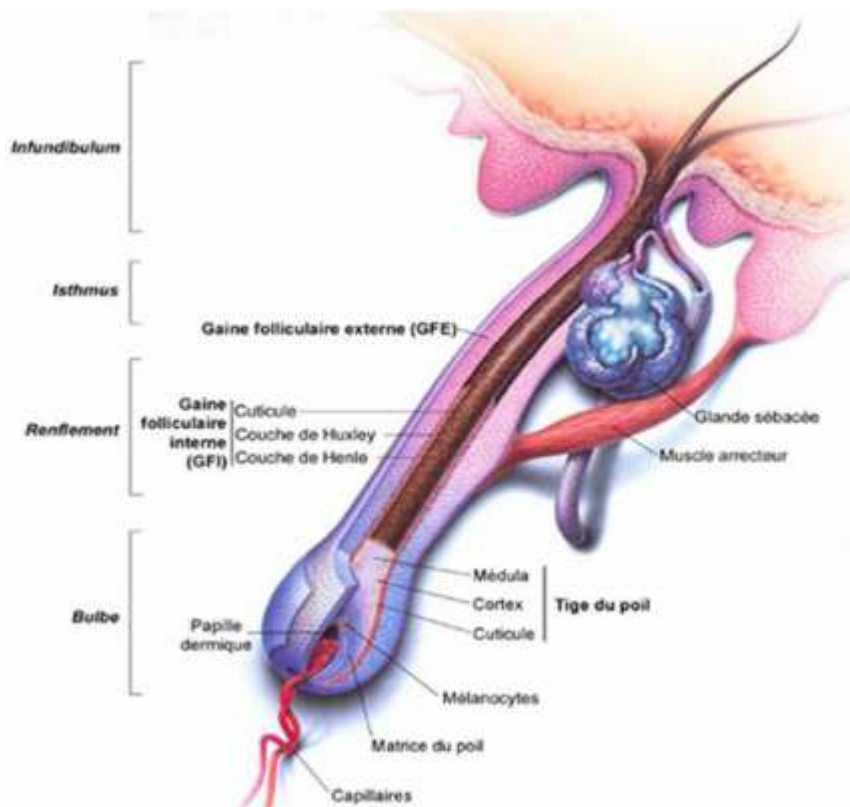


Figure 2: Coupe longitudinale de poil en phase anagène. On distingue le poil (H), la gaine épithéliale interne, (I), la gaine épithéliale externe (O), la matrice (M), et la papille dermique (P) (d'après (Scott et Miller, 2011)).



En coupe transversale un poil issu du follicule pileux est composé de trois couches distinctes (Figure 3) : la zone centrale est la médulla composée de cellules partiellement kératinisées. Le cortex est la couche intermédiaire, très kératinisée, c'est la couche la plus importante et celle qui donne sa couleur au poil. Enfin la troisième couche, la cuticule est formée de cellules aplaties s'insérant comme des tuiles. A ces trois couches il faut ajouter, dans la gaine, la gaine épithéliale interne, la gaine épithéliale externe et la gaine fibreuse (Heath, 2008).

Figure 3: Coupe transversale de la gaine d'un poil, mettant en évidence les différentes couches concentriques : moelle (M), cortex (CO) et cuticule (CU) (d'après (Scott et Miller, 2011)).



I.1.2.A.b Croissance des poils

Le pelage change en même temps que les animaux vieillissent, et celui des adultes diffère parfois nettement de celui des jeunes, reflétant des besoins différents de régulation thermique, de camouflage et de communication sociale et sexuelle. On peut en effet distinguer jusqu'à cinq types de pelages différents dans certaines races équines, correspondant à une période de la vie de l'animal : naissance, poulain, yearling (1 an), pelage adulte d'été et d'hiver.

L'activité cyclique des follicules et le renouvellement périodique des poils permettent donc une adaptation saisonnière du pelage. Ce mécanisme est influencé par les changements de photopériode qui agit via l'hypophyse, l'hypothalamus et la glande pinéale en modifiant les taux de certaines hormones dont la mélatonine.

Les poils ne poussent pas de manière continue, mais par cycles. Le poil n'a ainsi pas la même durée de vie que le follicule qui l'abrite. On distingue trois phases : la phase anagène correspond à la phase de croissance du poil, durant cette phase les divisions au niveau de la matrice entraînent l'allongement du poil (la phase anagène peut elle-même être divisée en six phases, les stades I à IV correspondent à la phase pro-anagène durant laquelle il y a reprise de l'activité et différenciation, le stade V est appelée mésoanagène et correspond à la transition vers la croissance rapide, enfin le stade VI appelé aussi metanagène correspond à la phase post-éruptive du nouveau poil (Stenn et Paus, 2001)). Lors de la phase catagène qui suit, les mitoses s'arrêtent et la partie inférieure du poil subit une apoptose. Cette phase est suivie par la phase télogène, une phase de repos qui est marquée par l'inactivité de la matrice et une involution de la racine du poil. Enfin, sous la dépendance de signaux issus de la papille dermique le bulbe se réactive et un nouveau cycle débute (Fuchs *et al.*, 2001). Le cycle pileux est présenté dans les Figure 4 et Figure 5. Chez le cheval les poils en phase télogène restent en place et ne tombent que lorsqu'ils sont poussés par le nouveau poil. Le renouvellement est

asynchrone, chaque poil étant dans un moment différent du cycle à un même instant. L'intervalle entre les cycles est variable d'une race à l'autre.

Figure 4: Le cycle pileux (d'après Fuchs *et al.*, 2001)

(IRS : Inner Root Sheath – Gaine épithéliale interne, ORS : Outer Root Sheath – Gaine épithéliale externe)

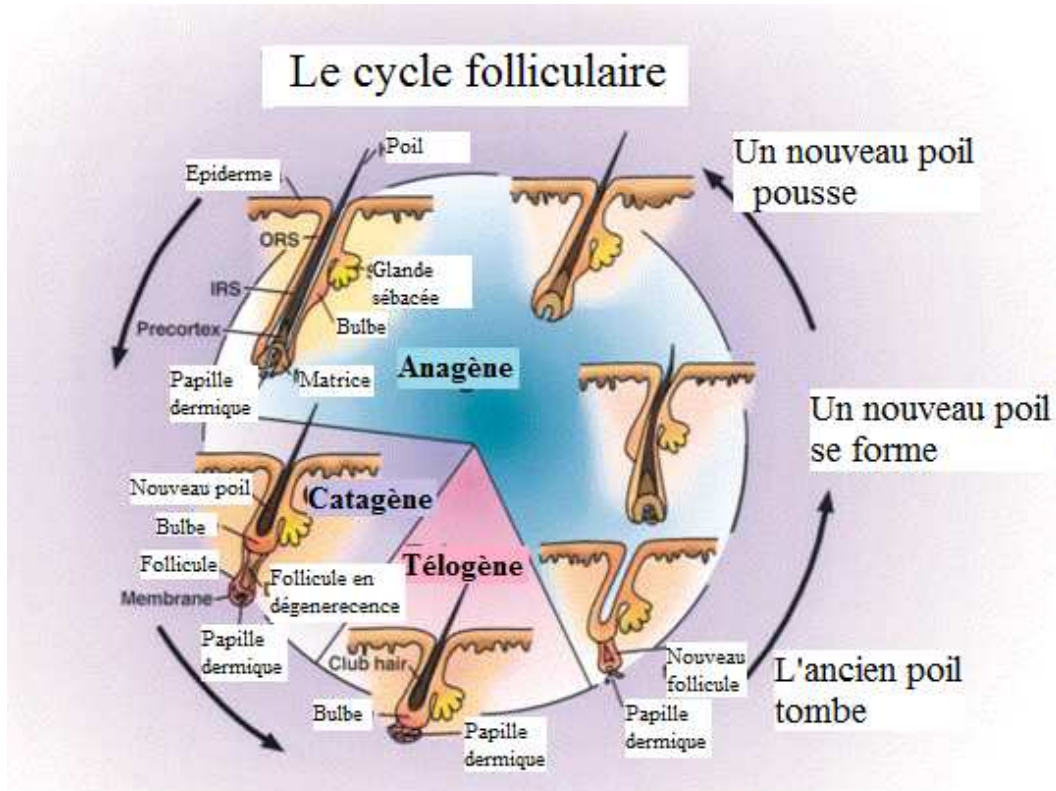
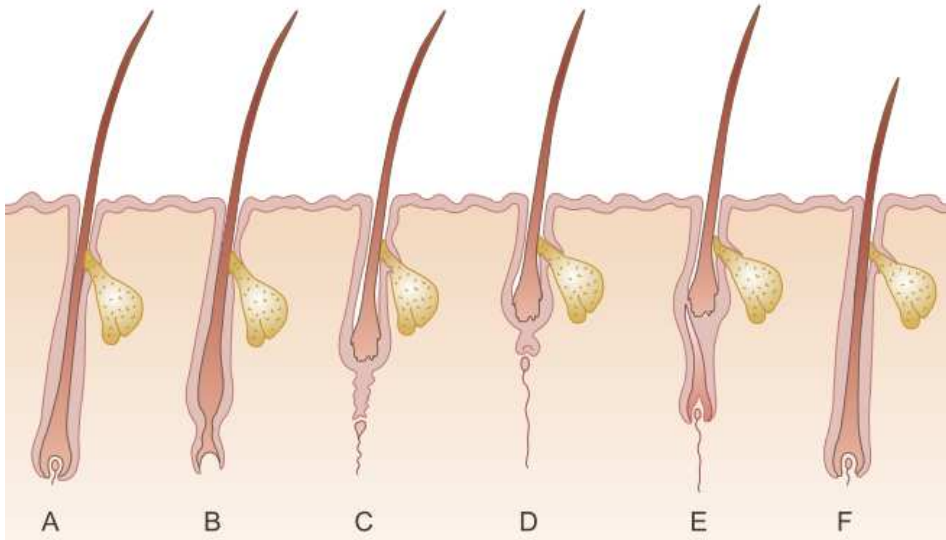


Figure 5: Le cycle pileux (d'après (Scott et Miller, 2011).

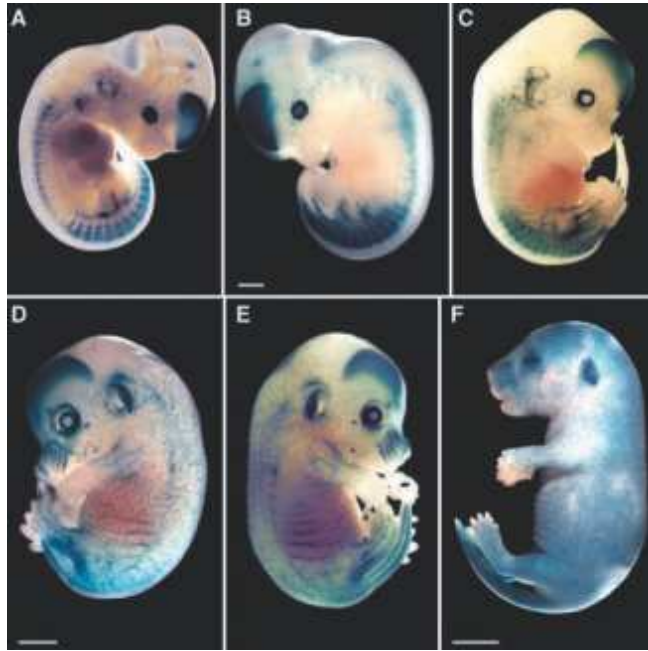
A : Phase anagène : Durant cette phase de croissance le poil est produit pas mitoses des cellules dans la papille dermique. **B :** Début de la phase catagène : Dans cette phase de transition, une constriction du bulbe a lieu, le poil prend une forme de club de golf. **C :** Phase catagène : La partie distale du follicule devient fine ce qui contribue à la sortie du poil. **D :** Phase Tégène : c'est la phase de repos, la papille dermique se sépare de l'ancien follicule et un nouveau germe se développe. **E :** Début de phase anagène : le nouveau germe englobe la papille dermique et un nouveau bulbe se forme, poussant l'ancien poil à l'extérieur. **F :** Phase anagène : le poil grandit à mesure que cette phase se poursuit.



II. LE DEVELOPPEMENT DES MELANOCYTES EPIDERMIS ET MELANOCYTES FOLLICULAIRES

D'un point de vue embryonnaire les mélanocytes dérivent de la crête neurale et migrent dans l'épiderme au début de la vie fœtale. La Figure 6 permet de suivre cette migration chez des embryons de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur *LacZ* sous le contrôle du promoteur de *Dct*, un gène spécifique de la lignée mélanocytaire (DOPAchrome tautomerase ou tyrosinase-related protein-2 *TyrP2*).

Figure 6: Répartition des mélanoblastes dans des embryons de souris à différents stades (E = jour de développement embryonnaire) visibles grâce au gène rapporteur *LacZ* qui engendre une coloration bleue des mélanoblastes : (A) E11.5 (B) E12.5 (C) E13.5 (D) E14.5 (E) E15.5 (F) E16.5. (A et B) les mélanoblastes sont fortement concentrés dans le tube neural et la région cervicale. (C) Les mélanoblastes ont commencé à se disperser ventralement et à couvrir le corps et la face. (D) La totalité de l'embryon est presque couverte. (E et F) Le nombre de mélanoblastes continue d'augmenter et les follicules pileux sont colonisés. (D'après Wilkie et al, 2002)



Chez la souris, les mélanoblastes des régions cervicales colonisent la face vers E12.5 (12.5^{ème} jour du développement embryonnaire, la détection du bouchon vaginal le matin étant considérée comme le jour du développement embryonnaire E0.5) tandis que la colonisation du ventre n'a pas lieu avant E13.5. Vers E14.5, ils commencent à envahir l'épiderme puis migrent vers les follicules pileux en développement où ils continuent à proliférer et se différencier. Le tronc de l'animal est envahi par beaucoup moins de précurseurs mélanoblastiques que les régions de la tête et de la queue, et les parties droite et gauche de l'embryon sont colonisées de manière indépendante. De plus, les descendants d'un même précurseur mélanoblastique couvrent des zones diffuses et chevauchantes (Jordan et Jackson, 2000; Wilkie *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 1996).

Les mélanocytes établissent dans l'épiderme une relation intime avec les kératinocytes où chaque cellule interagit symbiotiquement au sein d'une unité fonctionnelle et structurale appelée unité mélano-épidermique (« *epidermal melanin unit* ») (Figure 7 et Figure 8). Cette unité est dynamique et hautement réactive vis-à-vis des stimuli endogènes et exogènes : la communication complexe entre le mélanocyte, ses kératinocytes voisins et l'environnement épidermique voisin est responsable du niveau d'expression de la fonction mélanocytaire (Scott et Miller, 2011).

Figure 7: L'unité mélano-épidermique (d'après Delevoye *et al.*, 2011)

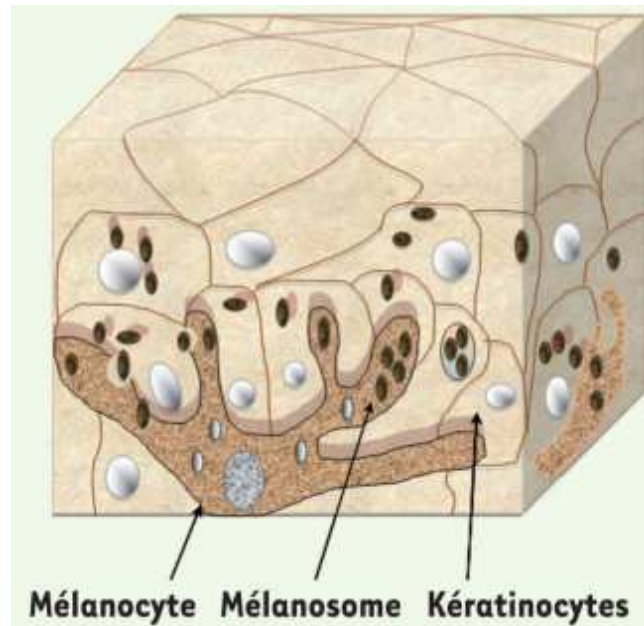
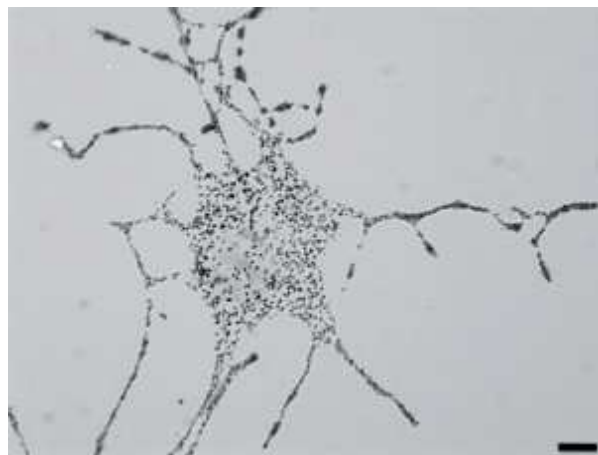


Figure 8: Les mélanocytes isolés, observés en microscopie optique, présentent de nombreuses extensions cellulaires (dendrites) ou s'accumulent les mélanosomes avant d'être transférés aux kératinocytes (d'après Delevoye *et al.*, 2011).



La plus grande partie de la mélanine de la peau est située dans la couche basale de l'épiderme mais chez les animaux noirs on peut en trouver dans l'ensemble de l'épiderme, en quantité décroissante de la couche basale à la couche cornée, et au sein de mélanocytes des couches superficielles du derme (Miller *et al.*, 2012; Scott et Miller, 2011).

Bien que les mélanocytes ne représentent qu'une petite partie des cellules de l'épiderme ils jouent d'importants rôles notamment un rôle cosmétique par la coloration (expression sociale et sexuelle) et un rôle protecteur vis-à-vis des radiations ultraviolettes.

Les mélanines sont en effet les principales responsables de la coloration de la peau et des poils au travers des deux pigments majeurs que sont l'eumélanine, de couleur marron à noire, et la phéomélanine, de couleur jaune à rouge. Ces deux pigments sont issus d'une même chaîne métabolique dont le précurseur est l'acide aminé tyrosine transformé en DOPAquinone par l'enzyme tyrosinase.

La mélanogénèse prend place dans les mélanosomes classés du stade I au stade IV en fonction de leur degré de maturation. Les mélanosomes auraient pour origine l'appareil de Golgi selon

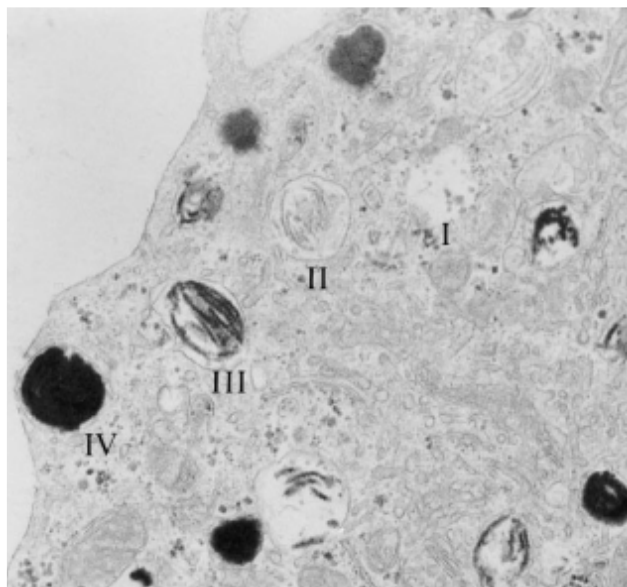
certaines études (Kushimoto *et al.*, 2001; Yasumoto *et al.*, 2004a) tandis que d'autres études ont apporté des arguments en faveur de l'origine endosomale (Berson *et al.*, 2001; Raposo *et al.*, 2001) des mélanosomes. Les mélanosomes de stade I ne contiennent pas de mélanines et apparaissent transparents au microscope électronique. A mesure que la mélanine se dépose sur les matrices protéiques, les mélanosomes deviennent opaques. Dans le même temps ils migrent vers les dendrites où ont lieu les transferts aux kératinocytes voisins.

Les acteurs moléculaires impliqués dans le transport des protéines mélanosomales et la biogenèse des mélanosomes peuvent être la cible de mutations dans des maladies génétiques desquelles pourra résulter des variations de robe comme une hypopigmentation.

I.2 Biogénèse du mélanosome

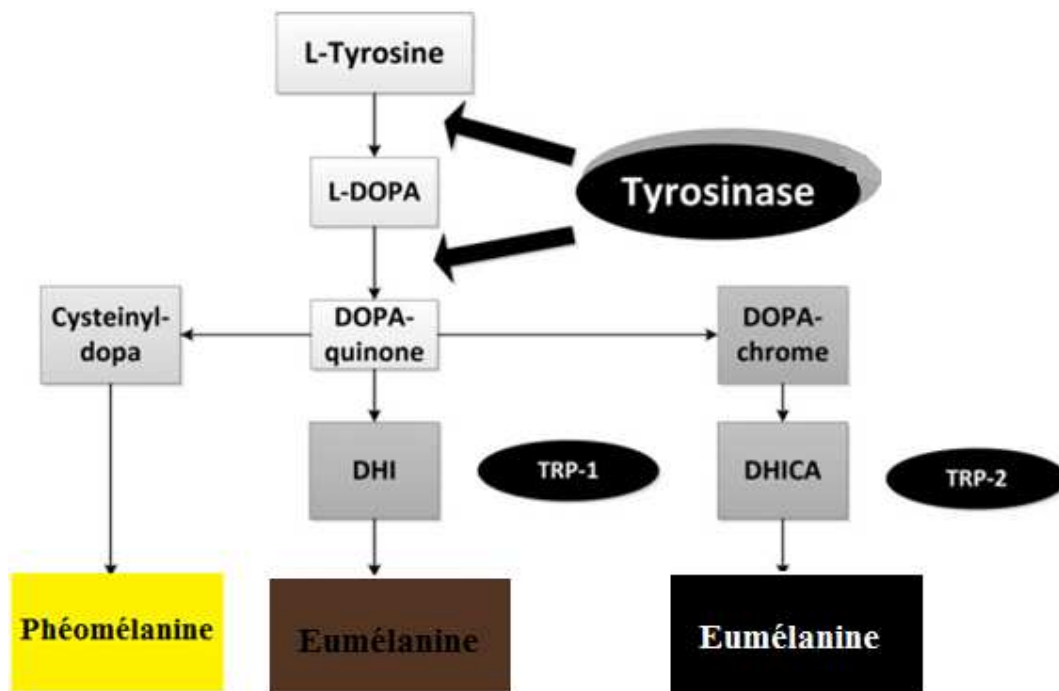
La mélanogénèse débute par la formation d'organites non pigmentés appelés prémélanosomes (stades I et II). Du fait de leur morphologie, composition et accessibilité à la voie d'endocytose, les stades les plus précoces (stade I) correspondraient à des endosomes communs à la voie d'endocytose et à la biogénèse des mélanosomes (Raposo *et al.*, 2001). La séparation des deux voies a lieu lors de la formation des prémélanosomes de stade II qui, eux, adoptent une forme ellipsoïdale particulière dite en ballon de rugby. Cette particularité morphologique est due à la présence de fibres protéiques de nature amyloïde qui servent de support physique à la séquestration de la mélanine. Le constituant principal de ces fibres est une protéine transmembranaire appelée PMEL17 (*Premelanosomal Protein 17*) (Berson *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2008). La polymérisation de PMEL17 constitue l'élément de base de ces fibres, mais les mécanismes d'adressage de la protéine au mélanosomes restent mal compris (Delevoye *et al.*, 2011). Des mélanosomes à différents stades sont présentés sur la Figure 9.

Figure 9: Biogénèse des mélanosomes, les différents stades sont visibles sur cette vue d'un mélanocyte en microscopie électronique (Raposo *et al.*, 2001).



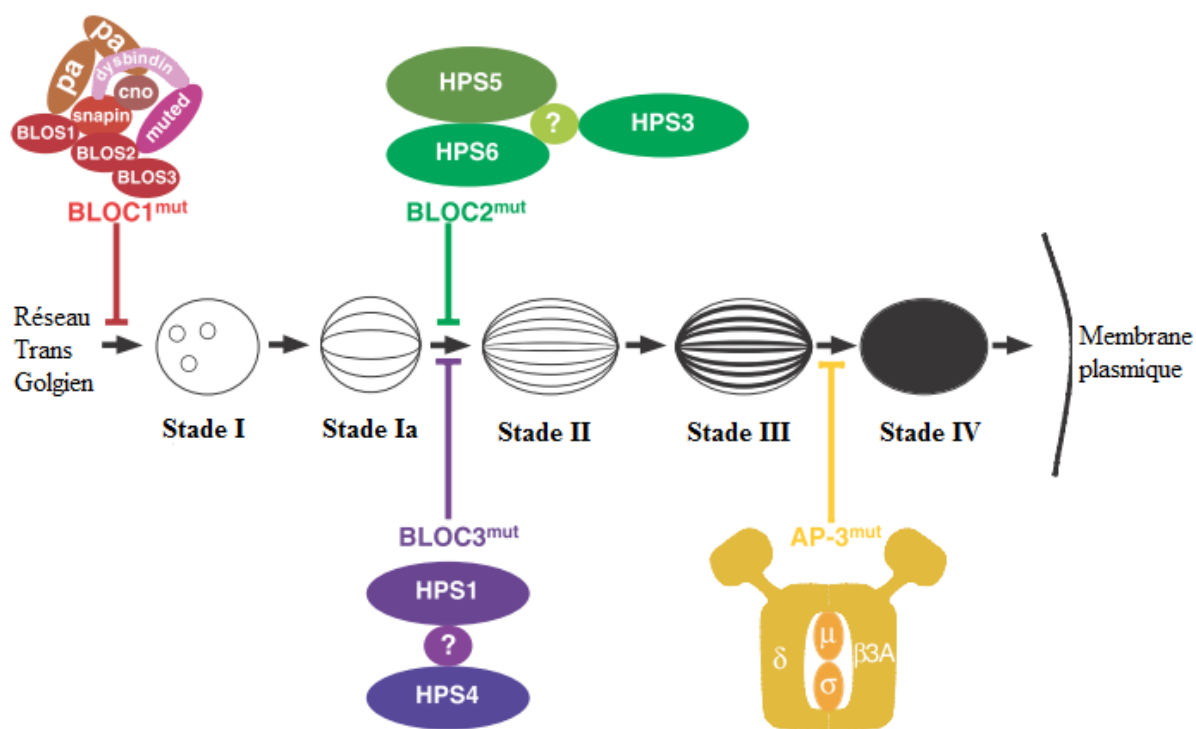
Afin de produire la mélanine, le mélanosome doit posséder les enzymes de la mélanogénèse. En effet la réaction chimique responsable de la synthèse des différents types de pigment fait intervenir au moins trois enzymes transmembranaires spécifiques des mélanocytes : la tyrosinase (TYR), TYRP1 codée par le gène *Tyrp1* (*tyrosinase-related protein 1*) et TYRP2 codée par le gène *Tyrp2* aussi appelée DCT (*DOPAchrome tautomerase*). La tyrosinase catalyse la formation des précurseurs de la phéomélanine et de l'eumélanine, alors que TYRP1 et TYRP2 permettent la synthèse de l'eumélanine, comme le montre la Figure 10. Aucune enzyme intervenant dans la voie de synthèse de la phéomélanine n'a encore été mise à jour (Ebanks *et al.*, 2009).

Figure 10: Biosynthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine faisant intervenir les enzymes Tyrosinase, TYRP1 (TRP-1) et TYRP2 (TRP-2), à l'intérieur des mélanosomes (d'après Videira *et al.*, 2013). DHI: 5,6-dihydroxyindole, DHICA: Acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique. L'étude de la maladie d'Hermansky-Pudlak (HPS), une maladie autosomique récessive qui s'accompagne d'hypopigmentation chez l'homme, a permis de mettre en évidence le rôle des protéines de transport des enzymes vers les mélanosomes (Wei, 2006). En effet il a été montré que la séquestration et l'adressage de l'enzyme tyrosinase était sous la dépendance d'une protéine nommée AP-3 (*adaptor protein-3*), et que lors de mutation du gène correspondant, une partie de la tyrosinase s'accumulait dans les endosomes sans être délivrée aux mélanosomes, donnant aux souris mutantes *Ap-3* un phénotype dilué appelé *pearl* ou *mocha* (Gautam *et al.*, 2006; Theos *et al.*, 2005). Cette observation a permis de mettre en évidence le rôle d'une autre protéine nommée AP-1, qui prend en charge et interagit avec la tyrosinase et TYRP1 (Delevoe *et al.*, 2009).



En plus d'AP-1 et AP-3, des mutants de souris ont permis la mise en évidence des complexes BLOC (*biogenesis of lysosome related organelles*), eux aussi impliqués dans le transport des enzymes aux endosomes et leur adressage aux mélanosomes (Figure 11). Au nombre de trois, BLOC-1, -2 et -3, ces complexes sont formés de plusieurs protéines sous unités, notées par exemple BLOC1s4 pour la sous-unité 4 de BLOC1. BLOC1 comprend huit sous unités, BLOC2 en compte trois et BLOC3 en compte deux. Dans les modèles de souris pour le HPS, les gènes correspondant à 5 de ces sous unités ont été mutés et sont à l'origine des phénotypes *capuccino*, *sandy*, *reduced pigmentation*, *muted* et *pallidin*, phénotypes marqués par une hypopigmentation due à la rétention de TYRP1 dans les endosomes et à l'inactivation de la tyrosinase par rétention d'un cofacteur (Delevoeye *et al.*, 2011; Di Pietro *et al.*, 2006; Hearing, 2005; Raposo et Marks, 2007; Setty *et al.*, 2008, 2007).

Figure 11: Schéma de la biogénèse des mélanosomes montrant les lieux d'intervention des différentes protéines d'adressage (d'après Wei, 2006). La protéine BLOC1 (biogenesis of lysosome related) est constituée de huit sous-unités : BLOC1s1, s2 et s3 (aussi appelée *reduced pigmentation*), Pallidin (pa), Cappuccino (cno), Muted, Dysbindin et Snapin. La protéine BLOC2 est constituée de trois sous-unités : HPS3 (Protéine du syndrome Hermansky et Pudlak 3), HPS5 et HPS6. La protéine BLOC3 est constituée de deux sous-unités : HPS1 et HPS4. La protéine AP-3 (adaptor protein-3) est constituée de quatre sous unités notées $\beta 3A$, δ , $\mu 3$ et $\sigma 3$.



La Figure 11 permet de visualiser les lieux d'activité des différentes protéines intervenant dans l'adressage des et aux mélanosomes. Ainsi des mutations des gènes codant les sous unités de BLOC1 sont responsables de l'accumulation de mélanosomes de stade I et de vésicules morphologiquement anormales manquant de structure intraluminaire assurées par la polymérisation de PMEL17. Lorsque les gènes codants BLOC2 sont mutés on a observé une accumulation de mélanosomes de stade Ia, semblables aux mélanosomes de stade I mais qui possèdent cette fois des striations intraluminaire. Des mutations dans *Bloc3* ont le même effet mais une étude a montré que son expression semblait être régulée différemment en fonction de la localisation anatomique des mélanocytes (Nguyen *et al.*, 2002).

I.3 Le transport des mélanosomes

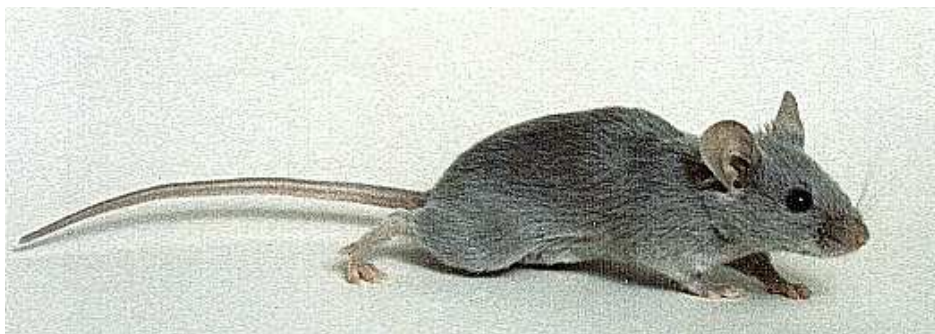
Dans le mélanocyte, les mélanosomes les plus pigmentés, de stade III et IV, se trouvent à la périphérie. Le mécanisme de migration de ces mélanosomes utilise des moteurs moléculaires comme les kinésines (protéine KIF13) permettant un déplacement sur les microtubules, puis les myosines (comme la protéine MYO5A) permettant le déplacement du complexe sur les filaments d'actine périphériques.

La capture d'un mélanosome par une myosine s'effectue grâce à l'action de deux protéines, la mélanophiline (MLPH ou parfois appelée SLAC2) et RAB27a (Barral et Seabra, 2004; Hume *et al.*, 2007; Kuroda *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002). Les mutants de souris pour les gènes codant la Myosine Va, RAB27a et la mélanophiline sont respectivement nommés *dilute* (d), *ashen* (ash), et *leaden* (ln) et sont présentés dans les Figure 12 et Figure 13 (Matesic *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2000).

Figure 12: Génotypes de gauche à droite : 1) $Rab27a^{ash}/Rab27a^{ash}$ (*ashen*) 2) $Rab27a^{ash}/Rab27a^{ash} Myo5a^d/Myo5a^d$ 3) $Myo5a^d/Myo5a^d$ (*dilute*) 4) $Rab27a^{ash}/Rab27a^{ash} Myo5a^d/Myo5a^d Mreg^{dsu}/Mreg^{dsu}$ et 5) $Myo5a^d/Myo5a^d Mreg^{dsu}/Mreg^{dsu}$. $Mreg^{dsu}$ est le gène de la mélanoréguline muté, aussi appelé *dilute suppressor*, cette mutation annule les effets des mutations de *Myo5a* et *Rab27* sur les deux souris les plus à droite. (Mouse Genome Database Curatorial Staff, Images Obtained from the Mouse Locus Catalog. 2005, [<http://www.informatics.jax.org/>])



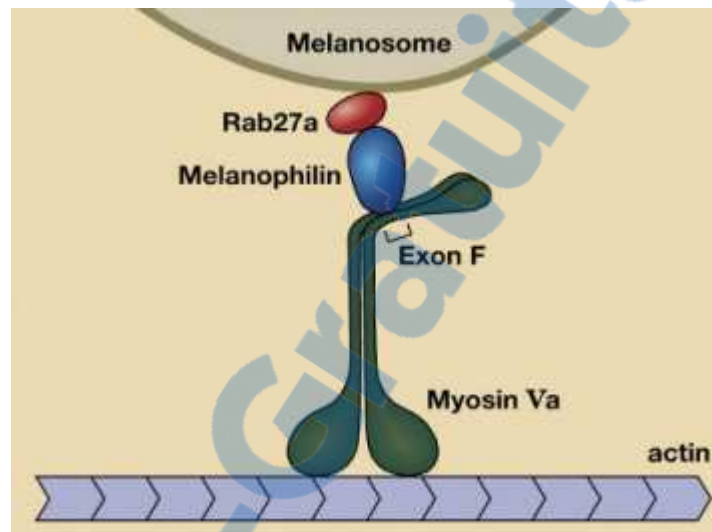
Figure 13: Phénotype *leaden* $Mlph^{ln}/Mlph^{ln}$. (Mouse Genome Database Curatorial Staff, Images Obtained from the Mouse Locus Catalog. 2005, [<http://www.informatics.jax.org/>])



Comme on le voit sur les Figure 12 et Figure 13 les souris mutées aux locus *Mlph*, *Rab27* et *Myo5a* sont diluées. *Mreg* est le gène de la mélanoréguline, aussi appelé *dilute suppressor*, cette mutation annule les effets des mutations de *Myo5a* et *Rab27* (Moore *et al.*, 1994, 1990; O'Sullivan *et al.*, 2004; Ohbayashi *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

Une fois capturé par la myosine, le mélanosome va pouvoir être transféré au kératinocyte. Un défaut de l'une de ces trois protéines empêche donc ce transfert et il en résulte une accumulation des mélanosome dans les mélanocytes (Figure 14).

Figure 14: La capture et le transport des mélanosomes est sous le contrôle de trois protéines : MYO5a, MLPH et RAB27a (Steingrímsson *et al.*, 2006)



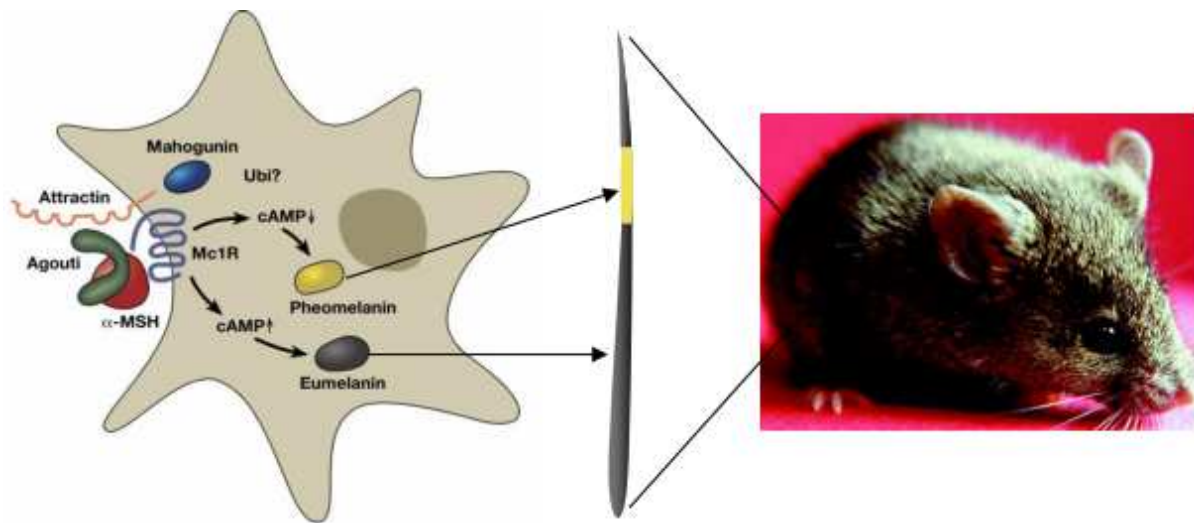
Suite à leur transport vers la périphérie du mélanocyte, les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes environnants, les mécanismes ne sont pas encore bien connus et plusieurs voies sont suggérées : par phagocytose des extrémités dendritiques, par exocytose des mélanosomes suivie d'une endocytose par les kératinocytes, par injection directe des mélanosomes aux kératinocytes par un pore transmembranaire ou bien par fusion des membranes du mélanocyte et du kératinocyte, les deux premières étant les plus envisagées (Seiberg, 2001; Van Den Bossche *et al.*, 2006; Yamamoto et Bhawan, 1994).

I.4 Régulation de la pigmentation pileaire

La robe de nombreux animaux sauvages se caractérise par un pelage dit « Agouti », et qui correspond à un poil avec deux bandes d'eumélanine noire encadrant une bande de phéomélanine jaune comme le montre la Figure 15. Le passage de la production d'un pigment à l'autre dans les mélanocytes est appelé « switch ». Celui-ci est sous contrôle du récepteur à la mélanocortine MC1R codé au locus *Extension*. Le récepteur est la cible de deux protéines : l' α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) et son antagoniste : la protéine Agouti codée au locus du même nom (aussi notée ASIP pour *Agouti Signaling Protein*). L'activation du récepteur par l' α -MSH conduit à la synthèse d'eumélanine tandis que l'inactivation par Agouti conduit à la synthèse de phéomélanine (Barsh, 1996; Jackson, 1994; Jackson *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994; Siracusa, 1994; Suzuki *et al.*, 1997).

Des expériences d'hybridation *in situ* avec un anticorps reconnaissant la protéine Agouti ont mis en évidence son expression au niveau des mélanocytes des follicules pileux en suggérant une action paracrine (Lu *et al.*, 1994; Matsunaga *et al.*, 2000)

Figure 15: Le phénotype agouti est sous contrôle du récepteur membranaire MC1R et des protéines Agouti et alpha-MSH (d'après Nizamani, 2008)



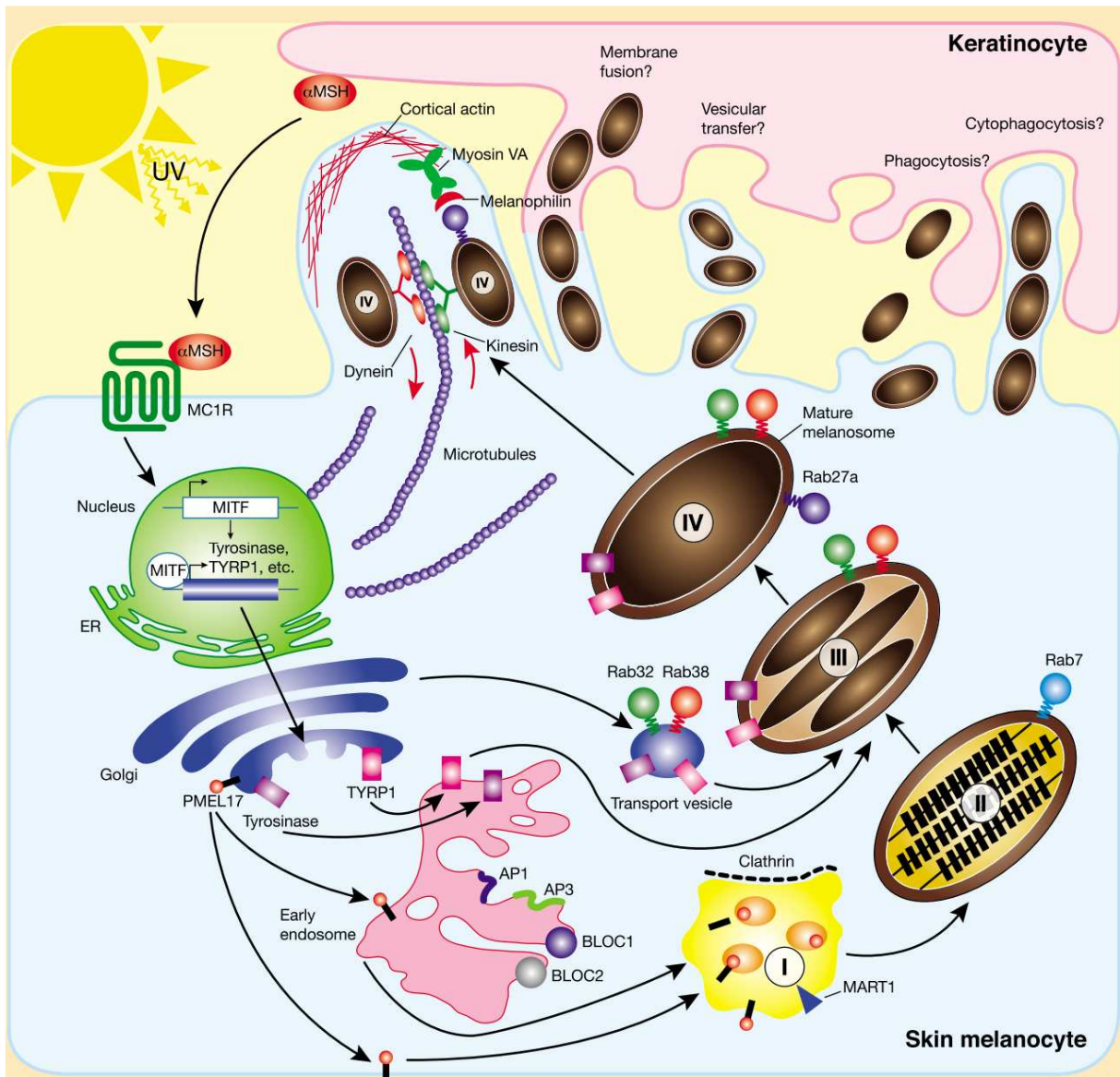
Une mutation perte de fonction dans le gène *Mclr* (telle que l'allèle *e* du locus *extension* qui code un récepteur MC1R tronqué) empêche la stimulation de l'expression des acteurs de la mélanogénèse et a pour conséquence un pelage jaune chez la souris. En revanche, une mutation gain de fonction du récepteur (*E_D*) provoque une activation constitutive de la mélanogénèse et donc un pelage noir (Bennett et Lamoreux, 2003). Le rôle de MC1R dans la pigmentation a été largement étudié chez les animaux domestiques comme le chien, le cheval, les bovins et même le lapin (Fontanesi *et al.*, 2012, 2010; Rieder *et al.*, 2001; Schmutz et Dreger, 2013; Schmutz *et al.*, 2002). Dans la majorité des cas, les mutations perte de fonction engendrent une pigmentation phéomélanique (rouge/jaune), alors que les mutations gain de fonction induisent une coloration eumélanique (noire).

Chez l'homme, plus de 70 allèles du gène *MC1R* ont été décrits et plusieurs mutations perte de fonction ségrègent dans les populations européennes et sont associées aux cheveux roux et aux peaux très blanches (Abdel-Malek *et al.*, 1999, 2008; Kadarko *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 1995).

I.5 Bilan

Le schéma suivant (Figure 16) récapitule l'ensemble des mécanismes que nous avons vus : sous l'action de l' α -MSH, le récepteur MC1R est activé et le signal est transduit au noyau où il active le gène *Mitf* codant un facteur de transcription activant la production d'enzymes comme la tyrosinase et TYRP1 dans l'appareil de Golgi. Ces enzymes sont incorporées aux mélanosomes grâce au concours des protéines BLOC1, BLOC 2, AP1 et AP3. Enfin les mélanosomes sont transportés par voie antérograde sur le réseau de microtubules grâce aux kinésines et par voie rétrograde grâce aux dynéines. En périphérie de la cellule les mélanosomes sont pris en charge sur les filaments d'actine par le complexe MYO5a-RAB27a-MLPH, avant d'être transférés aux kératinocytes par fusion des membranes, exocytose ou phagocytose (Wasmeier *et al.*, 2008).

Figure 16 : Schéma récapitulatif de la biogenèse des mélanosomes (Wasmeier *et al.*, 2008)



III. DETERMINISME DES COULEURS DE ROBE

CHEZ LES CHEVAUX

I.1 Robes de bases

On distingue trois robes de bases chez le cheval : Noir, Bai et Alezan. Ces trois couleurs résultent de l'action de deux locus : *Extension* (E) qui code le récepteur MC1R et *Agouti* (A) qui code la protéine ASIP. A ce jour l'implication du gène *TYRPI*, responsable chez la souris d'une modification de noir à brun de la couleur de l'eumélanine et de la couleur « brown », n'a pas été mise en évidence chez le cheval (Rieder *et al.*, 2001).

I.1.1 Le locus *Extension*

Il existe deux allèles pour le locus *Extension* : l'allèle dominant noté *E* qui code le récepteur membranaire MC1R actif et qui permet donc la production des deux pigments (eumélanine et phéomélanine) et l'allèle récessif noté *e* codant pour un récepteur MC1R inactif.

L'allèle muté *e* est dû à la substitution en position 247 du gène *MC1R* équin d'une base C par une base T ce qui entraîne une mutation faux sens : une lysine remplace une phénylalanine en position 83 (Rieder *et al.*, 2001). Cette substitution joue un rôle apparemment fondamental en bloquant la possibilité de liaison entre l' α -MSH et le récepteur membranaire MC1R. Il n'y a alors plus de stimulation de la production d'eumélanine : le mélanocyte ne produit que de la phéomélanine, la robe du cheval est alezan.

I.1.2 Le locus *Agouti*

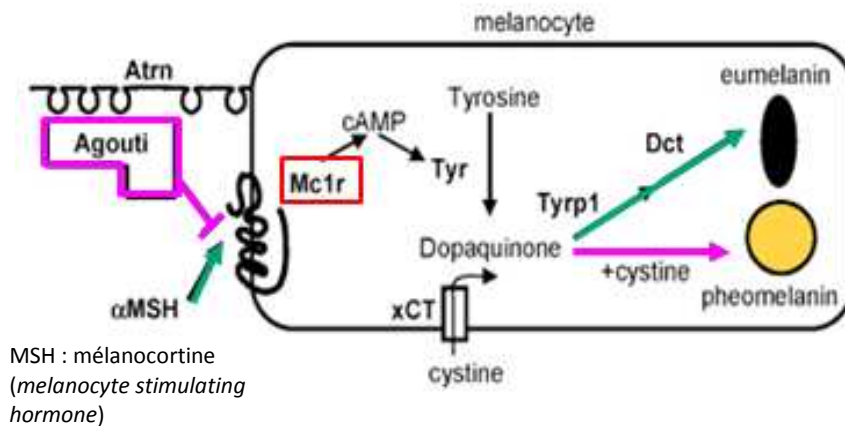
Chez le cheval, la couleur noire est récessive, la transmission du phénotype suggérait donc l'existence de deux allèles pour le locus *Agouti* : l'allèle *A* dominant sauvage et l'allèle *a* récessif muté. L'allèle *A* code pour protéine ASIP active, son expression se caractérise par une restriction de la production de l'eumélanine aux extrémités (crins et membres) comme chez le cheval de Przewalski (couleur dite bai). L'allèle récessif *a* code une protéine ASIP inactive dont l'expression se caractérise par une coloration uniforme de la robe : la protéine ASIP ne régule plus le récepteur MC1R qui transmet alors un signal de production élevée d'eumélanine au mélanocyte, le cheval est noir.

D'un point de vue moléculaire il a été montré que la mutation causale est une délétion de 11 nucléotides dans la partie codante, au niveau de l'exon 2 du gène *ASIP* équin. Cette mutation constitue vraisemblablement une mutation perte de fonction rendant la protéine inactive (Rieder *et al.*, 2001).

L'existence d'un troisième allèle nommé *At*, récessif par rapport à *A* et dominant sur *a* est supposée car elle permettrait notamment d'expliquer les variations de nuances observées dans la couleur bai (couleur dite bai-brun, noir-pangaré ou encore *seal brown*). Cet allèle n'a cependant pas encore fait l'objet de publications.

La Figure 17 montre les mécanismes moléculaires associés à la protéine Agouti et au récepteur MC1R : l' α -MSH circulante active le récepteur transmembranaire MC1R couplé à une protéine G, qui active une voie de signalisation grâce à l'AMP cyclique (AMPc). La tyrosine est oxydée en dopaquinone, une réaction catalysée par la tyrosinase (TYR). L'AMPc pourrait également activer les enzymes de la voie de synthèse de l'eumélanine TYRP1 et DCT. Quand ces trois enzymes sont fonctionnelles, de l'eumélanine se dépose dans les mélanosomes. La protéine Agouti, antagoniste de l' α -MSH, se lie au récepteur MC1R et réprime ainsi la voie de signalisation AMPc dépendante en diminuant la concentration en AMPc intracellulaire, ce qui aboutit à un « switch » de la production vers la phéomélanine.

Figure 17: Mécanismes moléculaires de la production des mélanines foncées (eumélanine) et claires (phéomélanine) grâce aux protéines ASIP et MC1R (d'après Hoekstra, 2006) .



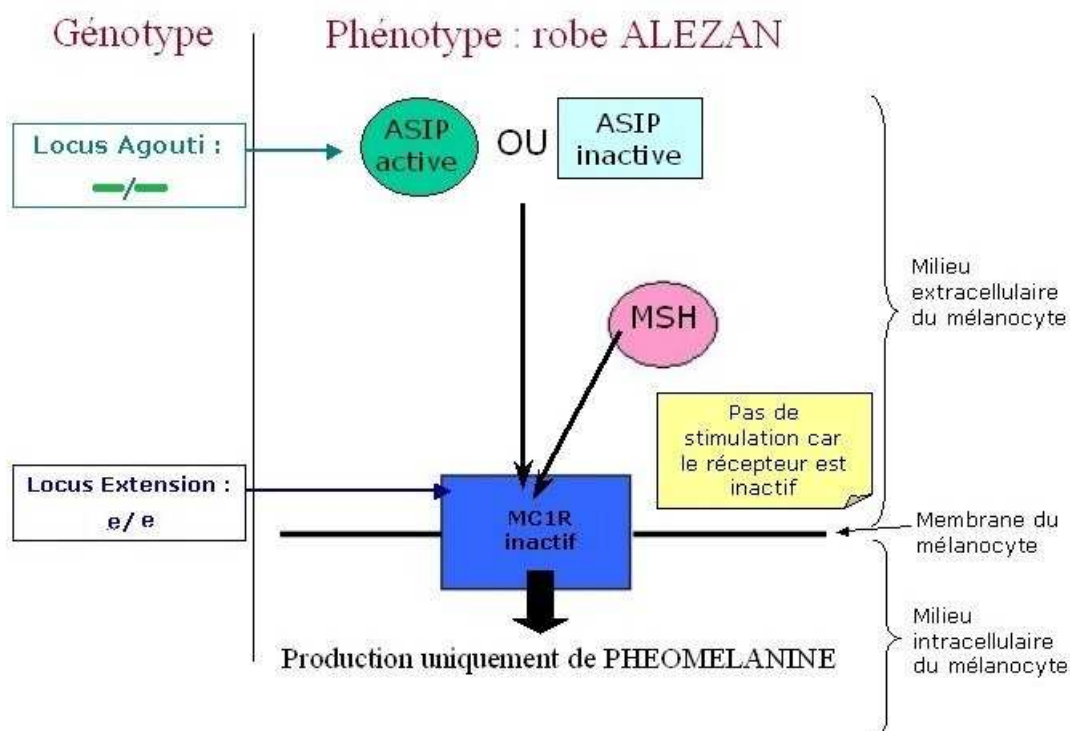
I.1.3 La robe « Alezan »

Les chevaux alezans ne produisent pas d'eumélanine mais seulement de la phéomélanine, ils sont donc homozygotes pour l'allèle *e* récessif du locus *Extension* : génotype *e/e*

La mutation *e* étant épistatique sur les allèles du locus *Agouti* (en effet elle « shunt » l'action de celui-ci puisque le récepteur est inactif), toutes les combinaisons d'allèles pour *Agouti* sont possibles chez les chevaux *e/e*.

Ceci confirme la règle d'incompatibilité de filiation, basée sur la couleur : deux parents alezans ne peuvent engendrer qu'un produit alezan (Figure 18).

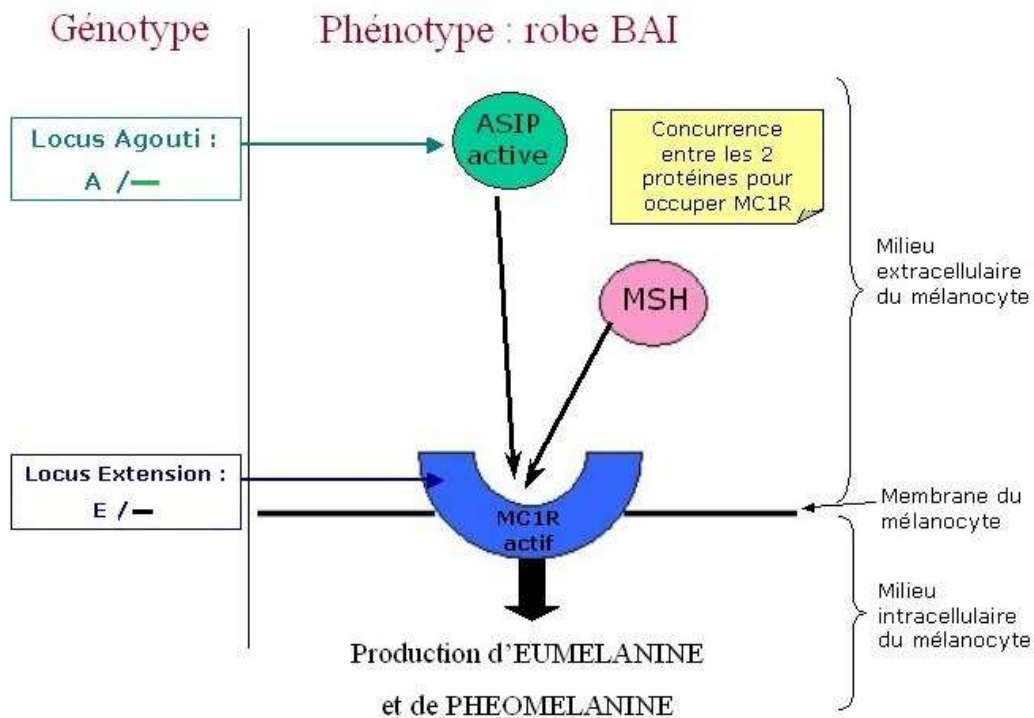
Figure 18: Génotype et phénotype de la robe Alezan chez le cheval. Source: Haras nationaux.



I.1.4 La robe « Bai »

Les chevaux bais présentent des pigments de phéomélanine et d'eumélanine avec une distribution particulière puisque cette dernière est restreinte aux extrémités. Ainsi les chevaux bais possèdent un récepteur MC1R ainsi qu'une protéine Agouti fonctionnels. Ils ont donc au moins une version sauvage à chaque allèle : génotypes *E/E* ou *E/e* et *A/A* ou *A/a* (Figure 19).

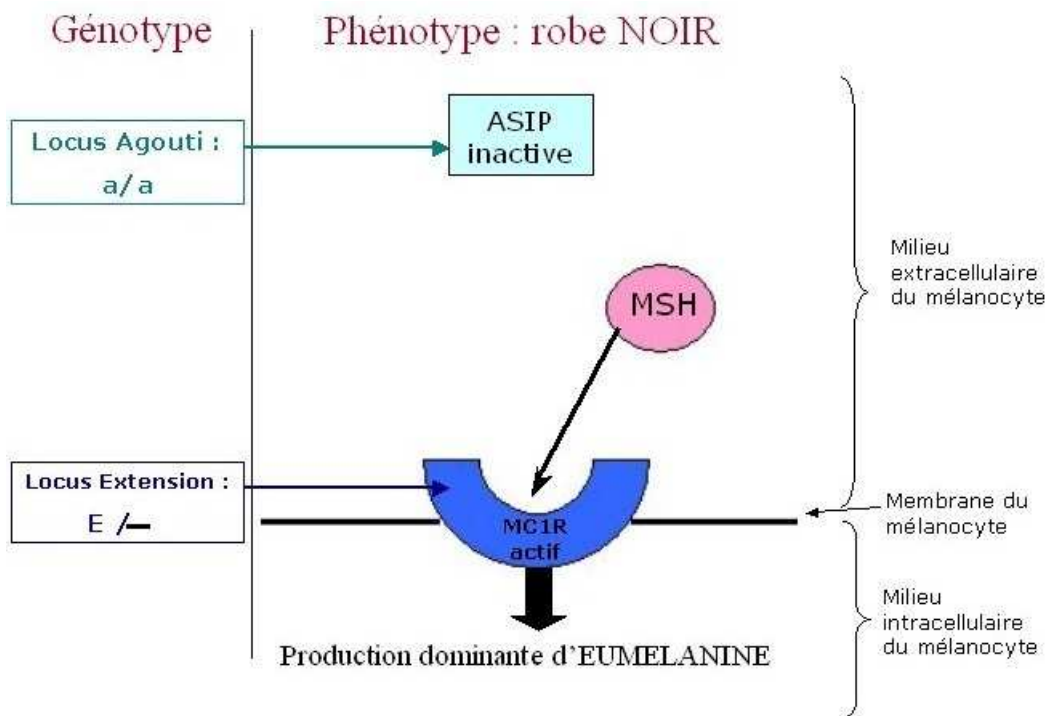
Figure 19: Génotype et phénotype de la robe Bai chez le cheval. Source: Haras nationaux.



I.1.5 La robe « Noir »

Comme les individus bais, les chevaux noirs produisent de la phéomélanine et de l'eumélanine mais contrairement à ces derniers, l'eumélanine est cette fois distribuée sur tout le corps. Cela signe un non fonctionnement de la protéine Agouti. Les individus noirs possèdent donc au moins une copie fonctionnelle du récepteur MC1R et sont en revanche homozygotes mutés au locus Agouti : génotypes E/E ou E/e et a/a (Figure 20).

Figure 20:Génotype et phénotype de la robe Noir chez le cheval. Source: Haras nationaux.



On peut résumer ainsi les différents génotypes possibles en fonction de la couleur de la robe de base (Tableau 1).

Tableau 1: Tableau des différents génotypes possibles en fonction des phénotypes des robes de base.

Robe de Base	Génotype du gène Extension	Génotype du gène Agouti
Bai	E/E ou E/e	A/A ou A/a
Noir	E/E ou E/e	a/a
Alezan	e/e	A/A ou A/a ou a/a

I.2 Robes de bases modifiées

A partir de ces trois robes de bases on peut obtenir toutes les autres couleurs de robes du cheval par différents mécanismes comme la dilution, le « blanchiment » ou la création de patrons.

I.2.1 Dilutions de la couleur de base

I.2.1.A Dilution crème : le locus *Cr* (*Cream*), gène *MATP* (*SLC45A2*)

Le locus *cream* ou *crème* à une action de dilution des pigments. Celle-ci est plus importante sur la phéomélanine que sur l'eumélanine. On connaît deux allèles pour ce locus (Mariat *et al.*, 2003) : *CR* co-dominant et responsable de la dilution et *cr* récessif sauvage. Du fait de la co-dominance, un individu homozygote *CR/CR* sera plus dilué qu'un individu hétérozygote *CR/cr* tandis qu'il n'y aura pas de dilution si l'animal est homozygote *cr/cr*.

Le Tableau 2 résume l'effet du locus crème sur la couleur de base du cheval.

Tableau 2: Effets de la dilution Crème sur les robes de base

Robe de Base	Génotype <i>cr/cr</i>	Génotype <i>CR/cr</i>	Génotype <i>CR/CR</i>
Bai	Bai	Isabelle	Perlino : peau rose, œil bleu et crins légèrement plus foncés que les poils.
Noir	Noir	« Smoky black » : faible dilution de la robe et œil clair (ambre ou noisette)	« Smoky cream » : ressemblent aux perlinos, mais en plus pigmentés
Alezan	Alezan	Palomino	Cremello : peau rose, œil bleu, crins ivoire

Quelques exemples de ces différentes couleurs sont présentés dans les Figure 21 à 26.

Robe de base Alezan :

Figure 21: Palomino : *e/e CR/cr*



Figure 22: Cremello : *e/e CR/CR*



Robe de base Bai :

Figure 23: Isabelle : $E/- A/- CR/cr$



Figure 24: Perlino : $E/- A/- CR/CR$



Robe de base Noir :

Figure 25: Smoky black : $E/- a/a CR/cr$



Figure 26: Smoky cream : $E/- a/a CR/CR$



Le gène *MATP* (*Membrane associated transporter protein*) code une protéine transmembranaire qui influencerait sur le pH ou l'osmolarité des mélanosomes. Dans les modèles de souris, les mutants montrent une diminution à la fois quantitative et qualitative de la pigmentation (Lehman *et al.*, 2000), mais aussi une forme anormale des mélanosomes qui apparaissent crénelés et de taille réduite (Lehman *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2001). Le mécanisme exact par lequel la protéine MATP interfère sur la mélanogénèse n'a pas encore été éclairci.

Une mutation à ce locus a été associée à la couleur crème chez le cheval (Mariat *et al.*, 2003).

I.2.1.B Dilution *Pearl* : le locus *Prl* (*Pearl* ou *Perle*)

Le locus *Perle*, noté *Prl* est assez peu connu, il n'existe pas de publication à son sujet mais un test génétique commercialisé existe (University of California, Davis (USA), Veterinary Genetics Laboratory, www.vgl.ucdavis.edu/services/horse/pearl.php). De la même manière que *Crème*, il agit par dilution sur les robes de bases. Il existe deux allèles : PRL, sauvage, qui n'entraîne pas de dilution et prl, l'allèle récessif responsable de la dilution.

Le locus *Pearl* interagit avec le locus *Crème* : si un individu est porteur d'un allèle récessif *Pearl prl* et d'un allèle dominant *Crème CR*, alors il y a une double dilution, et son phénotype ressemble à celui d'un individu homozygote *CR/CR* (et sans allèle *prl*).

Les robes obtenues avec les locus *Pearl* et *Cream* sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3: Effets de la dilution Perle sur les robes de base

Robe de Base	Génotype <i>PRL/PRL</i> ou <i>PRL/prl</i>	Génotype <i>prl/prl</i> et <i>cr/cr</i> , action de <i>Pearl</i> seule	Génotype <i>PRL/prl</i> et <i>CR/CR</i> ou <i>CR/cr</i> , action combinée de <i>Pearl</i> et <i>Cream</i>
Bai	Bai	Bai perle	Semblable à Perlino
Noir	Noir	Noir perle	Semblable à « Smoky cream »
Alezan	Alezan	Alezan perle ou Abricot	Semblable à Cremello

Un exemple de l'effet de la dilution Perle sur la robe de base alezan est présenté dans la Figure 27.

Figure 27: Alezan Pearl: *e/e prl/prl*



I.2.1.C Dilution Silver : le locus *Z* (*Silver*), le gène *PMEL17*

Le locus *Silver*, noté «*Z*» a un effet de dilution sur l'eumélanine. Deux allèles sont connus : l'allèle dominant *Z*, dont la présence est à l'origine de la dilution silver et l'allèle récessif sauvage *z* (Brunberg *et al.*, 2006)

Ses effets sont dépendants de la couleur de base de la robe:

- sur une robe de base noir : dilution de la robe en chocolat, avec des crins argentés ou lavés
- sur une robe de base bai : dilution de la robe en alezan (avec tout de même les extrémités plus foncées) et les crins argentés
- sur une robe de base alezan : très peu d'effet.

L'effet du locus *Z* est résumé dans le Tableau 4.

Tableau 4: Effets de la dilution Silver sur les robes de base

Robe de Base	Génotype <i>z/z</i>	Génotype <i>Z/Z</i> ou <i>Z/z</i>
Bai	Bai	Alezan crins argentés (« Bai Comtois » ou « Bai Silver »)
Noir	Noir	Chocolat crins argentés (« Noir Silver »)
Alezan	Alezan	Alezan

Des exemples de phénotypes Silver sont présentés dans les Figure 28 et 29.

Figure 28: Bai Silver : *E/- -/a Z/-* (Brunberg *et al.*, 2006) **Figure 29: Noir Silver *E/- a/a Z/-* (Brunberg *et al.*, 2006)**



La protéine PMEL, synthétisée grâce au locus *Silver* est nécessaire à la formation des fibrilles situées dans les mélanosomes et semble en être un des composants. Les fibrilles des mélanosomes constituent un support sur lequel les pigments seront déposés. Un défaut de ces fibrilles provoque ainsi un éclaircissement de la couleur. De plus la protéine PMEL17 n'est pas exprimée dans les phéomélanosomes ce qui expliquerait leur aspect rond et leur manque de fibrilles. (Theos *et al.*, 2005)

I.2.1.D Dilution Champagne : le locus *Ch* (*Champagne*), gène *SLC36A1*

Le locus *Champagne*, noté «*CH*», agit sur l'eumélanine en la diluant en ce qui est appelé chez le cheval la couleur olive ou chocolat et sur la phéomélanine en la diluant en jaune ou or. Il existe deux allèles : *CH*, dominant et responsable de la dilution ; et *ch* qui n'entraîne pas de dilution (allèle sauvage).

La présence de l'allèle dominant du locus *Champagne* se caractérise par une peau à l'aspect rose tacheté de gris au niveau du nez, des yeux et des parties génitales ; des reflets métalliques des crins et de la robe ; ainsi que l'œil bleu à la naissance, qui évolue ensuite vers une couleur vert, ambre ou noisette.

L'effet du locus Champagne est résumé dans le Tableau 5.

Tableau 5: Effets de la dilution Champagne sur les robes de base

Robe de Base	Génotype <i>ch/ch</i>	Génotype <i>CH/ch</i> ou <i>CH/CH</i>
Bai	Bai	Champagne Ambre
Noir	Noir	Champagne classique
Alezan	Alezan	Champagne Or

Des exemples de phénotypes champagne sont présentés dans les Figure 30, 31 et 32 (Cook *et al.*, 2008).

Figure 30: Champagne Or *e/e A/- CH/-*



Figure 31: Champagne Ambre *E/- A/- CH/-*



Figure 32: Champagne classique *E/- a/a CH/-* (Cook *et al.*, 2008)



I.2.1.E Dilution Dun : le locus *D* (*Dun*)

Un autre locus de dilution, peu fréquent, a été décrit chez certaines races de chevaux : le locus *Dun* (*D*). En plus de provoquer une dilution, le locus *Dun* est responsable de l'apparition des marques « ancestrales » que l'on retrouve notamment chez les chevaux de Przewalski, à savoir la tête cap de maure (tête plus foncée que le reste du corps), les extrémités foncées, la raie de mulet (bande plus foncée s'étendant du garrot à la queue), la croix scapulaire (bande plus foncée descendant du garrot sur les deux épaules) et les zébrures au niveau des membres (Figure 33). Il existerait deux allèles : *D*, dominant responsable de la dilution et *d* sauvage (sans effet).

Figure 33: Cheval de Przewalski: extrémités sombres, présence de zébrures



Le locus *Dun* a été cartographié à proximité d'un groupe de marqueurs microsatellites situés sur le chromosome 8 (Bricker *et al.*, 2003). La mutation n'a cependant pas encore été identifiée, pas plus que la protéine codée.

Le Tableau 6 résume l'action du locus Dun sur la robe de base.

Tableau 6: Effets de la dilution Dun sur les robes de base

Robe de Base	Génotype <i>d/d</i>	Génotype <i>D/d</i> ou <i>D/D</i>
Bai	Bai	Bai Dun
Noir	Noir	Souris ou Grullo
Alezan	Alezan	Alezan Dun

La Figure 34 présente un exemple de phénotype Dun.

Figure 34: Cheval Noir Dun *E/- a/a D/-* : dilution en souris (ou grullo), apparition de la raie de mulot et de zébrures sur les membres.



I.2.2 Modifications de la couleur de base autres que les dilutions

I.2.2.A Grisonnement : le locus *G* (*Greying*)

La robe grise est une robe apparaissant progressivement à partir d'une couleur de base. Ainsi les poulains « gris » naissent ainsi colorés, puis les pigments disparaissent progressivement aboutissant à un blanchiment de la robe.

Pielberg et collaborateurs (Pielberg *et al.*, 2008) ont démontré que le phénotype gris était lié à une duplication de 4,6 kb dans l'intron 6 du gène *STX17* (syntaxin-17).

Deux allèles existent pour ce locus, l'allèle dominant *G* responsable du blanchiment et l'allèle sauvage *g* (sans effet).

L'allèle *G* est épistatique sur tous les autres allèles impliqués dans la couleur.

Des exemples de grisonnement sont présentés dans les Figure 35 et Figure 36.

Figure 35: Jument grise avec son poulain pigmenté.



Figure 36: Poulain en cours de grisonnement.



I.2.2.B Rouan : le locus *Rn* (*Roan*)

L'action de ce locus entraîne une robe avec un mélange de poils colorés et de poils blancs, noté dans la nomenclature robe mélangée ou granitée. Il existe deux allèles : *RN*, dominant responsable de la couleur rouan et *rn* récessif non rouan. Les individus porteurs de l'allèle *RN* présentent une robe de base mélangée, une tête Cap de Maure, et les extrémités des membres

plus foncées. La mutation n'a pas encore été identifiée mais semble liée à un polymorphisme au locus *KIT* (Marklund *et al.*, 1999).

Des exemples de phénotypes rouans sont présentés dans les Figure 37, 38 et 39.

Figure 37: Alezan rouan, ou alezan granité/mélangé, appelé aussi robe aubère



Figure 38: Bai rouan (Photo : Malene Thyssen)



Figure 39: Noir rouan ou noir mélangé/granité (Photo : Seth Siegler)



I.2.3 Patrons

En plus des dilutions ou des autres modifications de la robe de base, certains animaux présentent également des modifications du patron de la robe, avec la présence, par exemple de panachures blanches.

I.2.3.A Patron Pangaré, le locus *P* (*Pangaré*)

Le patron Pangaré se caractérise par une décoloration du nez, des contours des yeux, du ventre et de l'intérieur des membres (ars). Il existerait deux allèles, *P* dominant responsable du patron pangaré et *p* récessif sauvage (sans effet).

Le pangaré pourrait se manifester sur les trois couleurs de base : bai pangaré, noir pangaré et alezan pangaré. Sur la robe bai il est facilement identifiable, les zones décolorées apparaissant crèmes à blanches (Figure 40). Sur la robe noire, les zones décolorées apparaissent rousses et le patron est plus difficile à apprécier. Le noir pangaré est parfois appelé bai-brun, bai-foncé, ou encore *seal brown* (Figure 41). Sur un cheval alezan, le patron pangaré est très difficile à apprécier.

Le locus ainsi que le gène en cause restent à ce jour inconnus.

Figure 40: Bai pangaré : décoloration blanche du ventre, du museau, de l'intérieur des membres et du contour des yeux.



Figure 41: Noir pangaré, décoloration rousse du ventre, du museau, de l'intérieur des membres et du contour des yeux (Photo : Anka Certik).

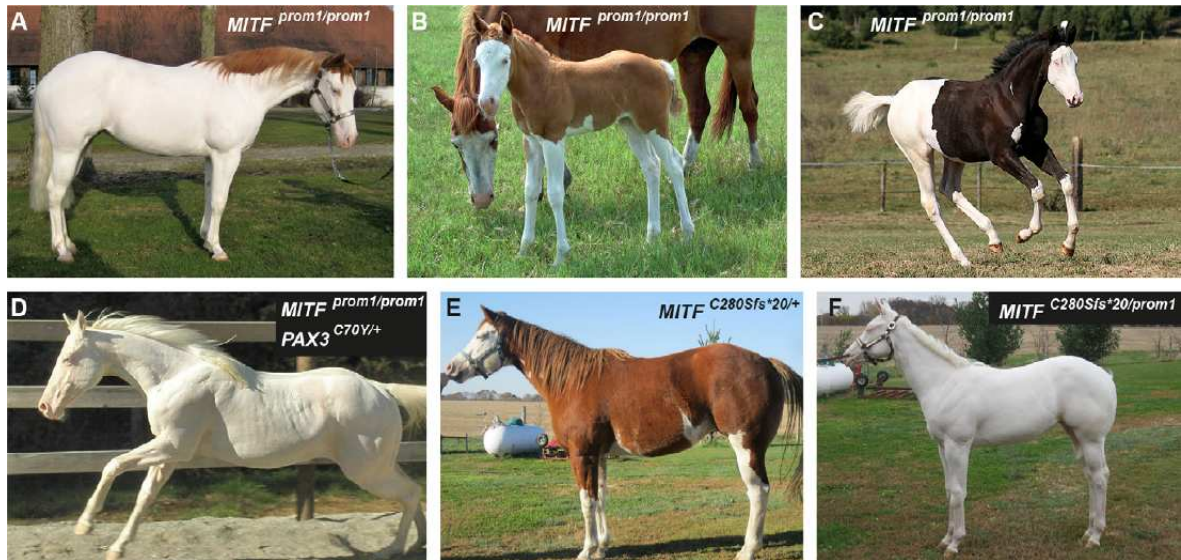


I.2.3.B Autres patrons identifiés

De nombreuses robes à panachures blanches (dites pies) ont été identifiées chez le cheval : Blanc dominant (gène *KIT*) (Haase *et al.*, 2007), Balzano ou Splashed white (gènes *MITF* et *PAX3*) (Hauswirth *et al.*, 2012), Overo (gène *EDNRB*) (Santschi *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1998), Tobiano (gène *KIT*) (Brooks *et al.*, 2007), Sabino 1 (gène *KIT*) (Brooks et Bailey, 2005) ou encore Léopard (gène *TRMP1*) (Bellone *et al.*, 2010, 2008). Nous ne détaillerons pas ces phénotypes, ni les locus en cause, les robes pies n'étant pas présentes dans les races asines françaises, sujet de notre étude.

Des exemples de phénotypes avec panachure blanche sont présentés dans la Figure 42.

Figure 42: Exemples de panachure blanche chez le cheval (Hauswirth *et al.*, 2012)



I.3 Autres robes mal caractérisées

Enfin d'autres robes ou motifs ont été décrits, sans que leurs bases génétiques et moléculaires aient été mises en évidence. Par exemple, un locus *Flaxen* serait responsable de l'aspect crins lavés (Figure 43). Il agirait uniquement sur l'alezan et l'allèle responsable semblerait fonctionner de manière récessive. La modification *Rubbicano* serait à l'origine de la présence d'un mélange de poils blancs dans la robe, qui se localiseraient au niveau de la base de la queue ainsi que parfois sur le ventre, les jambes et/ou les flancs.

La modification *Sooty*, ou *smutty*, serait responsable de l'effet fumé de la robe c'est-à-dire du mélange de poils noirs dans la robe de base.

La modification *Brindle* ou bringueure, très rare serait responsable de l'effet rayé de la robe (Figure 44).

Figure 43: Robe *flaxen* ou crins lavés



Figure 44: Robe bringée



IV. LES COULEURS ET TEXTURES DE ROBES

CHEZ LES ANES DOMESTIQUES

En France, sept races asines sont actuellement reconnues par les Haras Nationaux (www.haras-nationaux.fr/information/accueil-equipaedia/races-dequides/anes.html). Ce sont :

- l'Ane du Bourbonnais,
- l'Ane du Cotentin,
- l'Ane Normand,
- l'Ane de Provence,
- l'Ane des Pyrénées,
- l'Ane Grand Noir du Berry,
- le Baudet du Poitou.

Parmi ces sept races, cinq races ont fait l'objet de notre étude :

- l'Ane Normand,
- l'Ane de Provence,
- l'Ane des Pyrénées,
- l'Ane Grand Noir du Berry,
- le Baudet du Poitou.

Au sein des cinq races françaises sujets de cette étude, on peut distinguer différentes couleurs, selon les haras nationaux et les certificats d'origine des individus de ces races :

- les ânes Normands sont décrits comme bai ou chocolat (parfois noir pangaré pour certains).
- Les ânes de Provence sont décrits comme gris (gris dit parfois tourterelle lorsqu'il est clair avec des reflets rosés).
- Les ânes des Pyrénées sont décrits comme noir ou noir pangaré (parfois bai foncé pour certains).
- Les ânes grands noirs du Berry sont décrits comme noir ou noir pangaré (parfois bai foncé ou bai brun pour certains).

Toutes ces races sont à poils courts.

Notons que l'appellation noir pangaré est utilisée chez l'âne pour désigner une robe noire avec des reflets roux-acajou et pas pour désigner le réel patron pangaré qui consiste en un éclaircissement de certaines zones du corps.

La Figure 45 présente un individu typique et représentatif de chacune de ces races.

Figure 45: Appellations des couleurs au sein des différentes races françaises. Source : INAM, pour les associations de races des ânes français.



Au sein même de chaque race on observe une disparité assez importante de la couleur des robes comme chez les ânes Normands (Figure 46).

Figure 46: Variation de couleurs au sein des ânes Normands, du bai foncé en haut à gauche au bai chocolat en bas à droite. Source : Association de l'Ane Normand (<http://anenormand.free.fr>)



Les baudets du Poitou constituent une race à part, ils présentent en effet un pelage qui a la particularité d'être à poils longs, avec de grandes disparités en fonction des individus quant à la couleur et à la fourniture de ce pelage, tant en densité qu'en longueur. La couleur va ainsi du brun foncé en s'éclaircissant vers le brun « fougère ». Dans tous les cas, sous ce poil long, tous les individus présentent une robe noire sans croix scapulaire visible (Figure 47).

Figure 47: Variation de texture et de couleur au sein des baudets du Poitou. Source: INAM.



Notons de plus, que toutes les races asines françaises sont caractérisées par un vrai patron pangaré : le bout du nez, le tour des yeux et les ars sont éclaircis (blanc à crème). L'absence de ces éclaircissements est désigné sous le terme « bouchard » chez l'âne et constitue un défaut pour les races françaises.

La Figure 48 présente un âne bouchard.

Figure 48: Ane bouchard (non pangaré) : le nez, le tour des yeux et le ventre sont de la même teinte que le reste du corps.



Les descriptions des couleurs de robes des cinq races sujets de cette étude, d'après les standards des races, sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7: Descriptions des couleurs de robe et texture du pelage des cinq races asines françaises sujet de cette étude (d'après les standards des races)

Race	Robe avec croix	Robe uniforme	Couleurs admises	Texture	Source : club de race
Ane de Provence	Sur le dos une bande cruciale, bien marquée est toujours présente.	Non	La robe la plus typique est de type « gris tourterelle » (reflet rosé) et peut varier des teintes très claires aux teintes foncées.	Poil ras.	www.anedeprovence.org
Ane Normand	Avec bande cruciale bien visible.	Non	Bai dit « chocolat », Ventre gris blanc, incluant l'ars, l'aine et l'intérieur des cuisses Les ânes présentant le nez, le tour de l'œil ainsi que le ventre de la même couleur que la robe, ne sont pas admis.	Poil ras.	http://anenormand.free.fr
Ane des Pyrénées	Non	Oui	Robe sombre, sauf le bout de nez, le tour des yeux et les dessous qui sont blancs.	Poil ras.	www.anespyrenees.fr
Grand Noir du Berry	Non	Oui	Bai brun à bai brun foncé. Le ventre est gris blanc, incluant l'ars, l'aine et l'intérieur des cuisses.	Poil ras.	http://afagnb.free.fr
Baudet du Poitou	Non	Oui	Bai brun, passant quelquefois au jaunâtre (appelé fougère). Dessous du ventre et intérieur des cuisses gris clair, sans aller au blanc lavé.	Poil long.	www.racesmulassiersdupoitou.com

On constate donc qu'il n'existe pas de nomenclature officielle et standardisée pour décrire les couleurs de robes chez les ânes français.

Une même couleur noire avec des reflets bruns-roux pourra être appelée : noir, noir pangaré, bai brun ou encore bai foncé.

Cette difficulté d'appellation tient certainement au fait que la nomenclature équine a été utilisée pour l'espèce asine mais qu'elle ne décrit pas les teintes des ânes qui possèdent leurs couleurs spécifiques. Le gris de l'Ane de Provence n'a pas d'équivalent chez le cheval. Un âne normand n'est ni bai ni noir, il possède une teinte brune avec souvent des extrémités et des crins plus foncés. Le Baudet du Poitou possède une robe noire avec des reflets acajou, qui disparaît sous ses longs poils lorsque ceux-ci éclaircissent au cours de la vie de l'animal pour devenir brun clair dit « fougère ».

Le sujet de notre étude était donc de rechercher les bases moléculaires de la pigmentation et de la texture du pelage chez cinq races asines françaises, afin d'aider à leur caractérisation fine et de proposer une nomenclature spécifique à l'espèce asine qui tienne compte de ses particularités.

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1 Animaux

Initialement l'étude prévoyait un certain nombre d'animaux par race comme le montre le Tableau 8:

Tableau 8: Nombre d'animaux initialement prévus dans le projet

Robe	Standard	Extrême clair	Extrême foncé	Atypique	Total
Âne du Cotentin	3	3	3	3	12
Âne Normand	3	3	3	3	12
Âne de Provence	3	3	3	3	12
Grand Noir du Berry	3	3	-	3	6
Âne de Pyrénées	3	3	-	3	6
Baudet du Poitou	3 Brun fougère + 3 Noir Pangaré				6

Ces animaux ont été recrutés après sollicitation des propriétaires via les clubs de race auxquels ils appartenaient et ayant décidé de participer à l'étude après sollicitation de l'Institut National Asin et Mulassier (INAM) qui encadrait et finançait cette étude.

Pour chaque animal intégré à l'étude, le propriétaire devait nous faire parvenir :

- 2 tubes de 5mL de sang prélevé sur EDTA,
- Des échantillons de poils prélevés au niveau de l'encolure, du thorax, de l'abdomen, de la croix, si présente, et de la crinière,
- La feuille de prélèvement individuelle complétée,
- Une copie du pedigree,
- Une copie de la fiche de signalement,
- Une photographie de profil au minimum (envoi papier ou par mail).

Une fois le sang prélevé les tubes devaient être conservés au réfrigérateur à +4°C avant envoi à température ambiante par lettre simple. Ils étaient à nouveau stockés au froid dès leur réception.

Le Tableau 9 résume le nombre de prélèvements réellement reçus au cours de l'étude.

Tableau 9: Nombre d'animaux inclus dans l'étude au 01/09/2012

Robe	Standard	Atypique	Total
Âne du Cotentin	-	-	0
Âne Normand	11	1 (noir)	12
Âne de Provence	8	-	8
Grand Noir du Berry	3	3 (reflets bai)	6
Âne de Pyrénées	3	3 (des poils blancs, longs ou bais)	6
Baudet du Poitou	6		6

Total	38
-------	----

Par la suite, de nouveaux prélèvements de poils ou des brossettes buccales nous sont parvenus, ainsi qu'un petit nombre de biopsies de peau.

Nous avons également utilisé des ADN contrôles de chevaux disponibles au laboratoire.

Une race (âne du Cotentin) n'a pu être incluse dans notre étude initiale car les prélèvements nous sont parvenus trop tardivement. Cependant dix animaux ont été par la suite inclus et séquencés uniquement comme témoins pour la mutation poil long. De plus, deux ânes du Bourbonnais ont également été prélevés et séquencés uniquement pour la mutation poil long.

Le Tableau 10 présente l'ensemble des animaux et les types de prélèvements inclus dans l'étude, bien que tous n'aient pas forcément été séquencés pour l'ensemble des gènes candidats.

Tableau 10: Ensemble des animaux inclus dans l'étude

Race	Nom	Type de prélèvements	Robe déclarée
Normands (26 animaux)	Balthazar	Sang	Bai
	Euro	Sang	Bai
	Jeannot	Sang	Bai
	Kidane	Sang	Bai brun
	Marsa Vrill	Sang	Noir Pangaré
	Platero	Sang	Bai
	Quidam	Sang	Bai
	Quody	Sang	Bai
	Modestine	Brossettes buccales + poils	Bai
	Shanell	Brossettes buccales + poils	Bai
	Ovive	Brossettes buccales + poils	Bai
	Aesopia	Brossettes buccales + poils	Bai
	Ursinia	Brossettes buccales + poils	Bai
	Roudoudou	Sang	Noir Pangaré
	Sagaie	Sang	Noir Pangaré
	Virtuose	Sang	Chocolat
	Trésor	Sang	Bai
	Nicotin	Sang	Bai
	Violette	Brossettes buccales + poils	Bai
	Vivaldi	Brossettes buccales + poils	Bai
	Diva	Brossettes buccales + poils	Ânon Noir
	Douce	Brossettes buccales + poils	Ânon « rouge »
	Ulice	Brossettes buccales + poils	Bai
	Tania	Brossettes buccales + poils	Bai
	Sainquimge	Brossettes buccales + poils	Bai
	Djebel	Brossettes buccales + poils	Ânon « rouge »
Provence (17 animaux)	Ravanela	Sang	Gris
	Tepona	Sang	Gris tourterelle
	Valence	Sang	Gris

	Valouse	Sang	Gris
	Vikie 2	Sang	Gris
	Alpille	Sang	Gris tourterelle
	Navette	Sang	Gris souris
	Tiago	Brossettes buccales + poils	Gris
	Anabo	Brossettes buccales + poils	Gris
	Bruine	Sang	Gris
	Pin-Up	Sang	Gris
	Hercule	Sang	Gris
	Rubens	Brossettes buccales + poils	Gris
	Velour	Brossettes buccales + poils	Gris
	Orion	Brossettes buccales + poils	Gris
	Aliza	Brossettes buccales + poils	Gris
	Picholine	Brossettes buccales + poils	Gris
Pyrénées (14 animaux)	Aigle Noir	Sang	Noir Pangaré
	Altesse	Sang	Noir Pangaré
	Amic	Sang	Bai foncé
	Antésite	Sang	Noir Pangaré
	Karma	Sang	Noir Pangaré
	Ophite	Sang	Noir Pangaré
	Basile	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Kaly 4	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Bilou	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Vanina	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Voltaire	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Garot	Brossettes buccales + poils	Noir
	Praline	Sang	Noir
	Atal	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
Grands Noir du Berry (8 animaux)	Lord	Sang	Noir Pangaré
	Nationale	Sang	Noir Pangaré
	Scapin	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Pirouette	Brossettes buccales + poils	Noir Pangaré
	Noune	Sang	Noir
	Opium	Sang	Noir Pangaré
	Tourmaline	Sang	Noir
	Uscope	Sang	Noir
Baudets du Poitou (42 animaux)	Amant	Sang	Bai
	Pepito	Sang	Noir Pangaré
	Uda	Sang	Bai
	Umour	Sang	Noir Pangaré
	Victoire	Sang	Bai

	Vulcain	Sang	Bai
	Pardinesse	Brossettes buccales + poils	Bai
	Quittance	Poils	-
	Bohème	Poils	-
	Lalka	Poils	-
	Chipie	Poils	-
	Callyne	Poils	-
	Audace	Poils	-
	Laelia	Poils	-
	Quiétude	Poils	-
	Caline	Poils	-
	Ula	Poils	-
	Ubu	Poils	-
	Quinine	Poils	-
	Anouk	Poils	-
	Cuja	Poils	-
	Charmeuse	Poils	-
	Hermione	Poils	-
	Tagada	Poils	-
	Ora	Poils	-
	Cicéron	Poils	-
	Marmotte	Poils	-
	Calin	Poils	-
	Collyne	Poils	-
	Poppee	Poils	-
	Aloko	Poils	-
	Vahiné	Poils	-
	Quephren	Poils	-
	Azia	Brossettes buccales + poils	Bai
	Vaillant	Brossettes buccales + poils	Bai
	Ugolun	Brossettes buccales + poils	Bai
	Rainette	Poils	-
	Uranie	Poils	-
	Ulathe	Poils	-
	Charmeuse	Poils	-
	Roxanne	Poils	-
	Bahia	Brossettes buccales + poils	-
Cotentin (10 animaux)	Capucine	Sang	Gris
	Aria	Sang	Gris tourterelle
	Janette	Sang	Gris
	Toscan	Brossettes buccales + poils	Gris

	Titac	Brossettes buccales + poils	Gris
	Quenotte	Sang	Gris
	Petit Cotentin	Brossettes buccales + poils	Gris
	Bamba	Brossettes buccales + poils	Bai foncé
	Polden	Brossettes buccales + poils	Souris
	Vulcan	Brossettes buccales + poils	Gris
Bourbonnais (2 animaux)	Urticale	Brossettes buccales + poils	Chocolat
	Odon	Brossettes buccales + poils	-

I.2 Étude génétique

I.2.1 Sélection des gènes candidats

Comme nous l'avons vu, les races asines françaises présentent globalement trois couleurs de robes qui sont le noir chez les ânes des Pyrénées et les Grands Noirs du Berry, le bai chez les deux races précédentes et les ânes Normands, et le gris chez les ânes de Provence. En plus des variations de couleur, une variation de texture existe chez les Baudets du Poitou qui présentent à la différence des autres races un poil long.

En nous basant sur les données existantes dans la littérature, notamment celles chez le cheval, le chien, le chat, les bovins et la souris, nous avons effectué une approche basée sur la recherche de gènes candidats : par exemple, il était en effet légitime de penser que le gène impliqué dans la robe noire chez le cheval soit également responsable de la robe noire chez l'âne.

Nous avons donc exploité la littérature scientifique (base de données pubmed, National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, Rockville, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed et base de données ScienceDirect, Elsevier B.V© www.sciencedirect.com), les bases de données de génétique de la souris (Mouse Genome Database (MGD) at the Mouse Genome Informatics website, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, Septembre 2012-Juillet 2013 (URL: <http://www.informatics.jax.org>) et Montoliu L, Oetting WS, Bennett DC. Color Genes. (Septembre 2012-Juillet 2013). European Society for Pigment Cell Research (URL: <http://www.espcr.org/micemut>)), les bases de données de séquences (base de données Ensembl (URL : <http://www.ensembl.org/index.html>), NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville, USA, (URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) ainsi que toutes les informations disponibles auprès de laboratoires spécialisés dans la génétique de la robe chez le cheval (University of California, Davis (USA), Veterinary Genomics Laboratory, <http://www.vgl.ucdavis.edu/services/horse.php>. Animal Genetics UK, Equine genetics service (URL : <http://animalgenetics.eu/Equine/equine-index.html>)).

I.2.2 Extraction d'acides nucléiques

I.2.2.A ADN à partir de sang

Pour l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang prélevé sur EDTA, le protocole suivant a été appliqué :

- transfert du sang dans un tube de 50 ml type Falcon.
- Ajout de 5 volumes de Solution de Lyse des globules Rouges (SLR) pour chaque tube (TRIS 10 mM, MgCL2 5mM, NaCl 10 mM).
- Placement des tubes de 50 ml sur l'agitateur à rouleaux pendant 5 minutes à température ambiante.
- Centrifugation des tubes 10 minutes à 1500 tr/min à 4°C.
- Élimination du surnageant et récupération du culot cellulaire de globules blancs.

Le culot de globule blanc ainsi récupéré permet l'extraction de l'ADN avec l'automate Maxwell® Promega (Madison, Wisconsin, USA) en suivant les recommandations du fabricant (<http://france.promega.com/>). Le principe est le suivant : l'échantillon passe d'abord dans une solution de lyse (des globules blancs), puis l'ADN (chargé négativement) est mis au contact de billes chargées positivement auxquelles il se lie avant de passer dans cinq bains de lavage successifs et enfin un bain d'éluant qui sépare l'ADN des billes et le remet en suspension. A la suite de cette dernière étape, on place les tubes sur un rack magnétique qui concentre les billes et on récupère dans des tubes de 1,5ml l'ADN élué.

La concentration d'ADN a été mesurée via la mesure de l'absorbance grâce à un spectrophotomètre (Nanodrop®, Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, USA). Les ADN en solution ont ensuite été conservés à +4°C.

I.2.2.B ADN à partir de brossettes buccales

L'ADN issu de brossettes buccales a été extrait à l'aide de l'automate Maxwell de Promega (Madison, Wisconsin, USA) en suivant les recommandations du fabricant (<http://france.promega.com/>).

I.2.2.C ADN à partir de follicules pileux

L'ADN issu de poils prélevés en les arrachant (pour obtenir la racine) a été extrait à l'aide de l'automate Maxwell de Promega (Madison, Wisconsin, USA) en suivant les recommandations du fabricant (<http://france.promega.com/>).

I.2.2.D ARN à partir de biopsies de peau

Les ARN totaux issus de biopsies de peau ont été extraits après broyage des échantillons conservés dans du RNAlater (Ambion Inc, Life technologies SAS, Saint Aubin, France) à l'aide de l'automate Maxwell de Promega (Madison, Wisconsin, USA) en suivant les recommandations du fabricant (<http://france.promega.com/>). Les ARNm ont été extraits à l'aide du kit Ambion Poly(A) Purist MAG kit (Ambion Inc, Life technologies SAS, Saint Aubin, France).

I.2.3 PCR (Polymérase Chain Reaction)

I.2.3.A Dessin des amorces de PCR

Les amorces de PCR ont été dessinées à l'aide :

- du logiciel PSQ Assay Design (Biotage, Uppsala, Suède) pour les amorces de génotypage par pyroséquençage,
- du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) pour les amorces de PCR et de séquençage.

Les amorces ont été dessinées en utilisant les séquences équines (l'espèce asine n'est pas séquencée) disponibles dans la base de données de séquences Ensembl : <http://www.ensembl.org/index.html>

Pour le séquençage les deux amorces de PCR conventionnelles ont été utilisées, en respectant les recommandations fixées par le producteur de séquences (GATC Biotech, Constance, Allemagne, www.gatc-biotech.com) à savoir :

- une taille comprise entre 17 et 19 paires de bases.
- Une T_m (*melting temperature* ou température de demi-dénaturation) optimale entre 57 et 59°C.
- Pas plus de quatre bases identiques à la suite.
- Une amorce se terminant par une base G ou C.

Les amorces ont donc été choisies pour satisfaire au mieux ces règles. Elles devaient de plus encadrer des régions d'un maximum de 800 paires de bases pour permettre un séquençage de bonne qualité. Lorsqu'un exon était trop grand, il a été divisé en plusieurs fragments se chevauchants. Au contraire lorsque cela était possible deux exons étaient séquencés grâce à un seul couple d'amorces.

I.2.3.B Réaction de PCR

La réaction permet l'amplification des fragments d'ADN extraits en vue de leur séquençage. Nous avons pour cela utilisé les protocoles indiqués dans le Tableau 11 :

Tableau 11: Volumes utilisés pour les protocoles de PCR

	Séquençage	Pyroséquençage
Eau stérile	18,8 µL	36,5 µL
Amorces à 10µM	0,5 + 0,5 µL	1 + 1 µL
Nucléotides libres (dNTP 10mM)	0,5 µL	1 µL
Tampon avec MgCl ₂ à 1,5 mM concentré 10 fois	2,5 µL	5 µL
Taq Polymérase	0,2 µL	0,5 µL
ADN à 20 ng/µL	5 µL	5 µL
Volume total	25 µL	50 µL

Un kit de PCR commercial a été utilisé pour toutes les amplifications (QBiogen S.A. France, Courtaboeuf, France).

Les programmes des PCR utilisés l'étaient comme suit.

PCR avant séquençage :

- dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C
- 30 cycles composés de 3 phases : 30 secondes à 94°C, 40 secondes à Tm°C et 40 secondes à 72°C
- élongation finale de 5 minutes à 72°C

Les températures ainsi que les amorces utilisées pour les différents exons sont résumées dans le Tableau 12.

**Tableau 12: Températures et amorces utilisées dans les réactions de PCR et le séquençage des exons.
Prom : promoteur.**

	T°C de PCR	Amorce "forward"	Amorce "reverse"
ASIP Promoteur			
Asip Prom partie 1	56°C	aaagcaaggctgagagagg	gaggaggattggcagtgg
Asip Prom partie 2	56°C	tggatggagcccatgaac	agtgctcagctcggttgtg
Asip Prom partie 3	TD 67-60°C	cgagctgagcactgagaatg	ctggtctcctggctctgg
Asip Prom partie 4	56°C	ggaacaaaaagatcagatgtc	tgtcatcactgcctacatttcc
Asip Prom partie 5	56°C	atgccatccccatccttg	caaaggacttgctctctttgc
ASIP			
ASIP exon 1	60°C	acctgcctgactgccttc	ccttctcatgggctggag
ASIP exon 2	60°C	tgagtcccctcactcct	tcctagccagagcttgagg
ASIP exon 3	58°C	gcttcgatgacgaagggtg	ctcactgcacctgctga
D103			
CD103 exon1	57°C	agccagccctggacaag	gcgacctagcctgaattg
CD103 exon2	TD 57-52°C	ccacctttcatgggaagac	ttcaaggaggcatttttgc
DCT			
DCT exon 1	57°C	agcaaggagtggaaagtgc	cttgagcatgccgagtc
DCT exon 2	57°C	ttgccctctgtcatcacc	catcccaatcccaaac
DCT exon 3-4	57°C	tgtagacacatcccaggaagg	ggtgtctggatttcattgc
DCT exon 5	58°C	ttgaccttgaaggtagctg	tccagtctatcaagcacttc
DCT exon 6	TD 59-52°C	aaaagtggggcgaattg	aaccaccctatgatgcag
DCT exon 7	57°C	ccatggctcccctctctttc	gcatgaatgcccaacttag
DCT exon 8	57°C	ggcaaattggtttattctttcc	caactggccagcttcttc
FGF5			
FGF5 exon 1	58°C	agcgccgagatccgttc	ggacggggtttggaggag
FGF5 exon 2	53°C	tgcagtaataaagaatgggaag	tgattccattctacaaacg
FGF5 exon 3	58°C	gcccatggaattcttggttc	gctgaagctgtgtccaaaagtg
KITLG			
KITLG exon 1	TD 60-52°C	ttgccgtttccacattaag	tgcagtggtgagcagtgg
KITLG exon 2	TD 56-52°C	aggttccttggtgatggtg	caatgcaaatgatcccatc
KITLG exon 3	54°C	tgttgataagcgagatgg	atcccatgaatgcaagc
KITLG exon 4	58°C	tgagcccagactgaactgg	agtccccaaaaggccaag
KITLG exon 5	58°C	gccacgcaactgacac	tgctaagtggagccatgc

KITLG exon 6	TD 59-54°C	aggcctcaaatttcactgg	cccagcaacactcaccttc
KITLG exon 7	54,5°C	gctgcatgctgaagaaaac	gtgaaatggcaacgtcaag
KITLG exon 8	55°C	ttgccccaggaccaatac	ttgcccataacccttttg
MC1R			
MC1Rpart1	58°C	gtggcaccatgagctgag	gccacaaagaaggtagc
MC1Rpart2	58°C	gccatcgtggccatctg	gcaccacaccttcagag
MLPH			
MLPH exon 1	TD 65-58°C	ttgccccagaattc gatg	cacctgcgtatctggttg
MLPH exon 2-3	TD 65-58°C	gcaaaaagaaggggattgg	aatagccccctggacactg
MLPH exon 4	60°C	caacaggccagcagaaacg	gtcccttgcccctcactc
MLPH exon 5	TD 65-58°C	tggacaaatggatggatgg	gagcacgctcctgtttgg
MLPH exon 6	60°C	ggctcctcgggtttgtc	cagaccgctcccagag
MLPH exon 7	TD 65-58°C	aaagaccacgtgccaag	cagcatttgccaggactgc
MLPH exon 8	TD 65-58°C	gccccacaacatcagagg	ggtgtgtgcaatccatag
MLPH exon 9	TD 65-58°C	tggaaagtgggcttcacg	tgctcaaccctcctgac
MLPH exon 10-11	TD 65-58°C	aggacgcctcccagagtc	cactgttgccaaaccttcg
MLPH exon 12	TD 65-58°C	ggaagcacgtctggttg	tgcaattccaggagaaagg
MLPH exon 13	TD 65-58°C	catgcctcccagcattc	ctctccacggacctgtcg
MLPH exon 14	TD 65-58°C	gccaaagaatggaagatgg	caggggcataaggtagctg
MLPH exon 15	TD 65-58°C	ggagacggccctttgtg	gcagacaccctgcattgg
MLPH exon 16	TD 65-58°C	gtgcccattgtgtttc	cagccagggtccattac
PMEL17			
PMEL17 exon 1	58°C	gggcttgctccagtctcc	cacacaaccgcactcac
PMEL17 exon 2-3	58°C	gccctcatggtaccttcc	agggaattggagcccttag
PMEL17 exon 4-5	58°C	ccagggtttgagggtgac	cttctcctgcctgcaac
PMEL17 exon 6	TD 61-56,5°C	cctggcctggttctcacc	tgaacctcgttcactgg
PMEL17 exon 7-8	58°C	tgctcttcaatcctctcc	gggcaatcagtgggacac
PMEL17 exon 9-10	58°C	ccactgattgcctgctc	caccatccagcgtacacc
PMEL17 exon 11	TD 64-58°C	acagacaggctgccttg	gaggcattgctgtccacac
RAB27A			
RAB27a exon 1	60°C	gctcctcaggtgacagg	agaggcggggagagagg
RAB27a exon 2	TD 63-55°C	ttagtctcctggggacagg	ttccattgccagattg
RAB27a exon 3	TD 63-55°C	agagttcacgggtctcagaag	tcagctggcctttctg
RAB27a exon 4	60°C	gagggcactgctggtagc	aggagcggggagttagag
RAB27a exon 5	TD 63-55°C	atgccccgtccattcag	ccaaggcctacatcttgag
RAB27a exon 6	TD 63-55°C	ttccgcatgtgtttacgc	aggcctaattgggacgatg
TYR			
TYR exon 1	TD 62-55°C	atgctggagctgggagtg	aagcgattgctaaggttcc
TYR exon 2	TD 62-55°C	ccctcagaaaattgcttcc	ggccatatatgcctcatgtc
TYR exon 3	TD 62-55°C	aagaatccaatgcagaatg	gggagaaccgatctgag
TYR exon 4	TD 62-55°C	gggatctttccacatcttcg	ggattcggcaattcatgg
TYR exon 5	TD 62-55°C	ccaagtgtctgcctccaag	tccgatagcgggtctgcac
TYRP1			
TYRP1 exon 1	56°C	caaacggctgtgaaccag	cttgaggactgtgtgtcc
TYRP1 exon 2	56°C	atccccacaaggcagatg	aggcaccttgtctggagag

TYRP1 exon3	TD 58-56°C	tgccagggagtaaaccaag	gagccttcaggcagcac
TYRP1 exon 4	52°C	gcataccccatctttctcc	aggccaattcaagaacag
TYRP1 exon 5	56°C	agtgatccacacgggaaag	gctctgccatggaacaatc
TYRP1 exon 6	54°C	ttgggtcaccttcagaac	aacctcaggaatgctgtga
TYRP1 exon 7	56°C	aggtgctataacaggcaatgtg	tgtgcatgcataaggaagaaag
VPS33			
VPS33 exon 1	58°C	cgggcacgggttgattag	tcaggacgggattaggc
VPS33 exon 2	TD 60-56°C	gggtatgaatgtggtcagagc	tagaacaccggccaaagg
VPS33 exon 3	56°C	gtgcattgactgggagtg	ggagaaggggttgaatg
VPS33 exon 4	58°C	ccaggcagtggttagg	agtggctggggacgatg
VPS33 exon 5		acagtaaccggcccttcc	agcttcccctccccatc
VPS33 exon 6	58°C	aggtgggtggccaacag	cacttctcggccttgtgg
VPS33 exon 7	58°C	gagtgccaggcatgaag	ttggacctccgacctcc
VPS33 exon 8	58°C	ccctgctggatggttctg	cctggtgccaagaccac
VPS33 exon 9	TD 57-53°C	tgaacgttttgttctgctgc	ggcaaaacataggaatcaaac
VPS33 exon 10	TD 58-54°C	tggtctcgtgtctgctc	atccgcaaaacagaagc
VPS33 exon 11	53°C	accgaattgatgcgttgc	ttttaaagcaaggcagatg
VPS33 exon 12	TD 62-57°C	ccaaaaggccacagttagg	ggtagattggcctctgactcc
VPS33 exon 13	56°C	tcctgagtttcaaatgagctg	aaagagaagcagaaagggaaag

Certaines amorces nécessitaient des cycles appelées « Touch-Down » à des températures particulières, notées TD 62-57°C par exemple. Ce programme consistait en des cycles de PCR particuliers :

- dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C
- 1^{er} cycle à la température la plus haute selon les trois phases : 30 secondes à 94°C, 40 secondes à Tm°C et 40 secondes à 72°C
- diminution par palier de 1°C pour les sept cycles suivants (trois phases par cycle)
- 32 cycles à la température la plus basse (trois phases par cycle)
- élongation finale de 5 minutes à 72°C

PCR avant pyroséquençage :

- dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C
- 50 cycles composés de 3 phases : 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C
- élongation finale de 10 minutes à 72°C

La qualité des amplifications était ensuite vérifiée par une électrophorèse de 5µL du produit de PCR dans un gel d'agarose à 3% coloré au Gel Red (Biotium Inc., San Francisco, USA) et visualisation sous lampe bleue.

I.2.4 Purification

Lorsque cela était nécessaire (présence de bandes parasites accompagnant la séquence amplifiée), la séquence amplifiée était purifiée par extraction après migration sur un gel d'agarose grâce aux kits *Nucleospin Extract II* ou *Nucleotrap* de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne).

I.2.5 RT-PCR

Les ARN totaux ou les ARNm ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit SuperScript III RT d'Invitrogen (Paisley, UK).
Les amorces de PCR suivant la RT sont présentées dans le Tableau 13.

Tableau 13: Températures et amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR

	T°C de PCR	Amorce "forward"	Amorce "reverse"
TYRP1 cDNA	58°C	tgctgttcgaagccttcac	gaggctgagttgcttcatcc
ASIP cDNA	TD 62-56°C	tgctgttcgaagccttcac	gaggctgagttgcttcatcc
GAPDH (contrôle)	58°C	cgatgctggtgctgaatatg	tccacgactgacacgtagg

I.2.6 Séquençage

Le séquençage des différents exons a été obtenu après envoi de 7 à 10 µL de produit de PCR complétés avec de l'eau stérile aux 20 µL, et des amorces utilisées à 10 µM au laboratoire GATC (GATC Biotech, Constance, Allemagne, www.gatc-biotech.com).

I.2.7 Génotypage de SNP par pyroséquençage

Le pyroséquençage avait pour but de déterminer le profil allélique (génotype) des individus testés à différents locus afin de montrer s'ils possédaient ou non la mutation recherchée. Le pyroséquenceur est un appareil qui permet de séquencer une petite séquence de quelques dizaines de nucléotides faisant suite à l'amorce de séquence. Il permet donc de génotyper pour des SNP ou de très courtes insertions ou délétions.

Un appareil de recueil des monobrins d'ADN a été utilisé (Biotage, Uppsala, Suède : www.biotage.com). Des microbilles recouvertes de streptavidine (40 µl) ont été ajoutées à 40µl de produits de PCR. Les billes ont ensuite été récupérées par aspiration sur les tiges d'un peigne. Le peigne a ensuite été plongé dans les trois solutions suivantes pendant 5 secondes à chaque étape :

1. éthanol à 70°.
2. Solution de dénaturation (Biotage).
3. Solution de lavage (Biotage).

Les billes ont été déposées dans une plaque de 96 puits de pyroséquençage (Biotage) qui contenait l'amorce de séquençage à 1,6 µM en solution dans 40µl de tampon de séquençage (Biotage). Cette plaque a été placée à 90°C pendant 2 minutes pour achever la dénaturation. La plaque a été placée dans le pyroséquenceur (PSQ96, Biotage), assortie d'une cartouche contenant :

1. l'enzyme (polymérase, Biotage).
2. Le milieu réactionnel (Biotage).
3. Les quatre bases A, T, G, C (Biotage).

Les résultats ont été transmis directement à un ordinateur couplé au pyroséquenceur.

I.2.8 Logiciels utilisés

Le dessin des amorces de PCR et de RT-PCR a été réalisé grâce au logiciel Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

Les alignements de séquences nucléotidiques ont été effectués à l'aide du logiciel Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

La recherche de séquences conservées entre l'homme, le chien, le chat, le cheval, la vache et la souris a été effectuée grâce aux utilitaires BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour la recherche des séquences et VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) (Dubchak *et al.*, 2000) pour la comparaison.

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 (Quiagen S.A. France, Courtaboeuf France).

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/>) (Adzhubei *et al.*, 2010)

II. RÉSULTATS

De façon à identifier d'éventuelles mutations responsables de la couleur et de la texture de la robe chez les ânes nous avons procédé de la manière suivante :

- Sélection de gènes candidats pour chaque phénotype,
- Dessin d'amorces de PCR pour amplifier dans un premier temps les exons, à partir d'ADN génomique, de chaque gène,
- Analyse individuelle de chaque séquence et comparaison par alignement des séquences obtenues pour chaque exon,
- Identification des variations de séquence,
- Exploration de l'association éventuelle de chaque variant avec le phénotype étudié,
- Eventuellement, étude de l'impact fonctionnel du variant identifié.

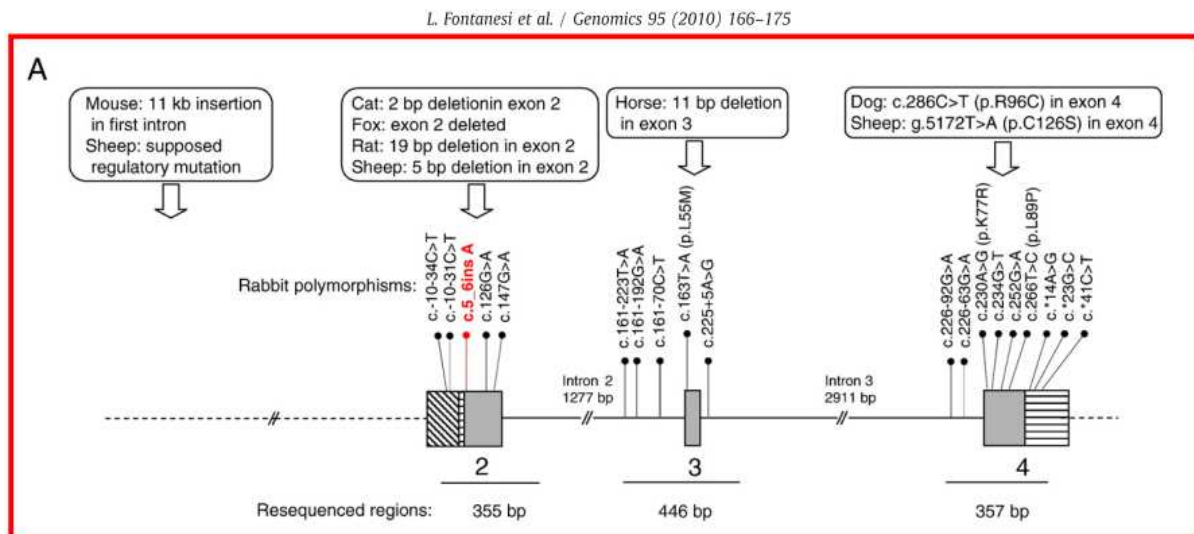
Pour certains gènes possédant un grand nombre d'exons, nous avons utilisé un séquençage à partir d'ADNc et non d'ADN génomique, afin de réduire les coûts et le temps d'analyse.

I.1 Gènes candidats retenus

I.1.1 Gènes candidats pour Noir/Bai/Chocolat

ASIP : comme nous l'avons vu précédemment chez le cheval, le gène *ASIP* est responsable de la robe noire récessive dans cette espèce par inactivation de la protéine suite à une délétion de 11 pb dans l'exon 2 (Rieder *et al.*, 2001). Chez la souris c'est l'insertion de 11 kb dans le premier intron qui est responsable de la robe noire (Bultman *et al.*, 1994, 1992). Chez le chien c'est une substitution dans l'exon 4 (R96C) qui est associée au noir récessif (Kerns *et al.*, 2004). Enfin chez le lapin, c'est une insertion d'une paire de base dans l'exon 2 amenant un codon stop prématuré qui est responsable de la robe noire (Fontanesi *et al.*, 2010). La structure du gène est présentée dans la Figure 49.

Figure 49: Organisation génomique du gène ASIP chez le Lapin. Les exons 2,3 et 4 sont figurés par des rectangles tandis que les régions non transcrites apparaissent en pointillé ou rayé. Les mutations identifiées dans les autres espèces sont reportées au-dessus. Source : Fontanesi *et al.* 2010.



Ainsi l'on voit que le gène *ASIP* est lié dans de très nombreuses espèces de mammifère au noir récessif, et il était donc légitime de le considérer comme un bon gène candidat pour le noir chez l'âne.

MC1R : le récepteur à la melanocortine (MC1R) est codé par le locus *Extension*. Une perte de fonction cause comme nous l'avons vu la production exclusive de phéomélanine, pigment ayant une couleur rouge à jaune. Au contraire, une activation permanente par l' α -MSH entraîne la production exclusive d'eumélanine de couleur brune à noire.

Chez le cheval l'inactivation du récepteur est responsable de la robe Alezan, qu'on ne retrouve pas dans les races asines françaises (Rieder *et al.*, 2001). Chez le mouton, un polymorphisme à ce locus a été associé avec la couleur de robe noir dominant (Våge *et al.*, 1999)

TYRP1 : la Tyrosinase-related protein 1 est une protéine des mélanocytes impliquée dans la production de l'eumélanine. Des mutations du gène *TYRP1* ont été associées chez la souris à la couleur marron, d'où le terme employé de locus *Brown* (B) (Zdarsky *et al.*, 1990). De la même manière, chez le chien, des variants dans *TYRP1* ont été associés à la couleur marron (Schmutz *et al.*, 2002), tout comme chez le chat de couleur dite chocolat (Lyons *et al.*, 2005; Schmidt-Küntzel *et al.*, 2005).

DCT = TYRP2 : la protéine Dopachrome tautomérase (DCT), anciennement dénommée TYRP2, joue tout comme TYRP1 un rôle dans la synthèse de l'eumélanine. Des mutations du gène ont été associées à des variations de couleur de marron à grise (mutant *slaty*, Figure 50) chez la souris (Guyonneau *et al.*, 2004).

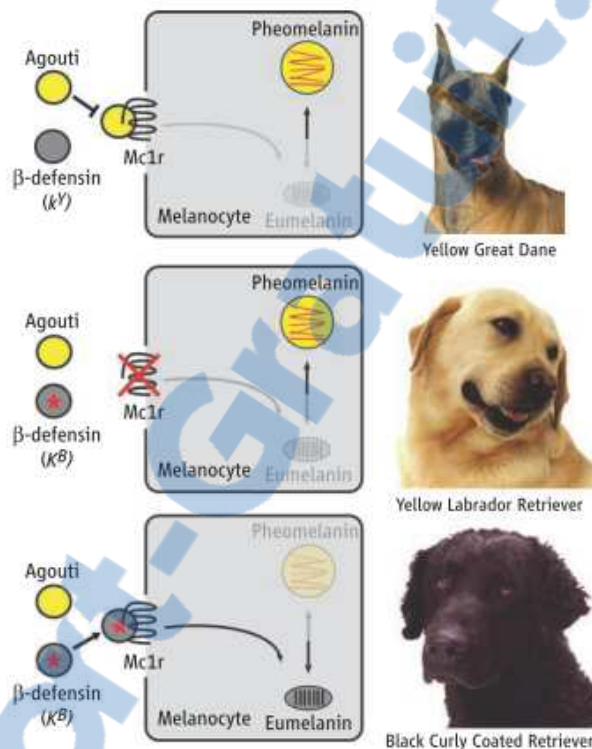
Figure 50: Photographie d'une souris non agouti (*a/a*) à gauche, brown au centre en haut (*b/b* au locus *Tyrp1*) et slaty (*slt/slt* au locus *Dct*) au centre en bas. Source: Montoliu L, Oetting WS, Bennett DC. *Color Genes*. (July 2013). European Society for Pigment Cell Research.



Beta defensin 103 (BD103) : il a été montré, chez le chien, l'implication de ce gène (présent au locus appelé *K*) dans la robe noire dominante (Candille *et al.*, 2007). Comme le montre la Figure 51, les chiens présentant les allèles sauvages aux locus *Agouti*, *Extension* et *K* ont une robe agouti (appelée fauve ou *yellow* en anglais), ceux portant la mutation perte de fonction du récepteur MC1R (*e*) ont une robe sable (exemple du Labrador retriever dit également

yellow en anglais) indépendamment de leur génotype aux locus *Agouti* et *K*, enfin ceux portant les allèles sauvages d'*Agouti* et d'*Extension* mais portant la mutation Noir dominant K^B auront une robe noire résultant de l'interaction entre le récepteur MC1R et la β -défensine. La β -défensine est un agoniste du récepteur MC1R qu'elle active constitutivement lorsqu'elle est mutée.

Figure 51: Chez le chien de génotype $A/-$, $E/-$, k^y/k^y (k^y étant l'allèle sauvage récessif du locus *K*), la couleur de la robe est fauve (*yellow* chez le Dogue Allemand *Great Dane*). Chez le chien Labrador de génotype $A/-$, e/e , et $K^B/-$ la couleur de la robe est sable du fait du récepteur MC1R inactif (mutation e) et chez le chien Labrador de génotype $A/-$, $E/-$ et $K^B/-$ la couleur de la robe est noire du fait de l'activation du récepteur MC1R par la bêta-défensine mutée. Source : (Candille *et al.*, 2007)



Nous avons donc retenu le gène *BD103* comme candidat.

I.1.2 Gènes candidats pour la robe Grise

PMEL17: la protéine *PMEL17* est impliquée dans la régulation de la maturation des mélanosomes (Theos *et al.*, 2005; Yasumoto *et al.*, 2004b)

Chez la souris, la mutation *silver* est due à l'insertion d'une base amenant un codon stop prématuré et donc une protéine tronquée de 25 acides aminés (Kwon *et al.*, 1995). Les souris mutées pour *Pmel17* ont un phénotype plus clair que celle portant l'allèle sauvage (Figure 52). Chez le cheval une mutation faux-sens (Arg618Cys) est associé au phénotype Silver (Brunberg *et al.*, 2006).

Chez la vache, il a été montré que les individus porteurs d'une mutation au locus *PMEL* (délétion d'une leucine au niveau du peptide signal) étaient plus clairs que les individus porteurs des allèles sauvages, et les homozygotes mutés étaient plus clairs que les hétérozygotes (Figure 53) suggérant un mécanisme de codominance (Schmutz et Dreger, 2013).

Enfin chez le chien une insertion dans le gène *PMEL17* a été associée à la dilution merle (Clark *et al.*, 2008).

Figure 52: Chez la souris, les mutants *Pmel* (-) sont toujours plus « dilués » que les individus non mutants à ce locus (+). Source: Montoliu L, Oetting WS, Bennett DC. Color Genes. (July 2013). European Society for Pigment Cell Research. (URL: <http://www.espcr.org/micemut>)

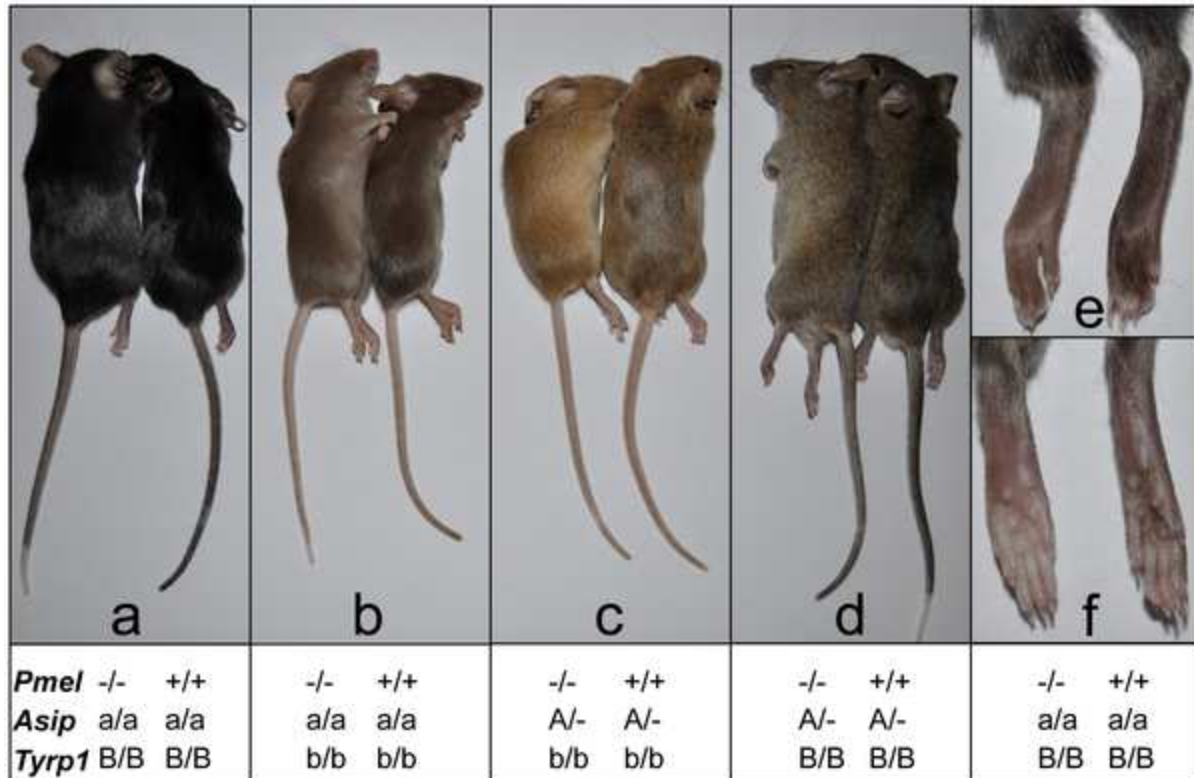


Figure 53: Chez les bovins, *PMEL* semble agir selon un mode de codominance en diluant la robe. La vache (a) est homozygote sauvage pour *PMEL*, la vache (c) est hétérozygote mutée et la vache (e) est homozygote mutée. Toutes trois sont *E*/- au locus extension (permettant la synthèse d'eumélanine noire). Adapté de (Schmutz et Dreger, 2013)



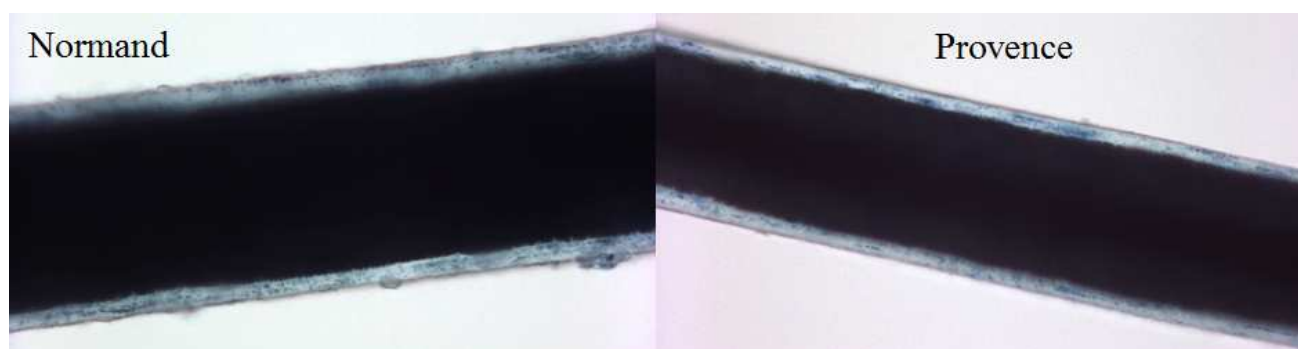
DCT = TYRP2: comme vu précédemment, des mutations à ce locus ont été associées à des variations de robe de marron à grise chez la souris (Guyonneau *et al.*, 2004).

MLPH, RAB27 et MYO5 : ainsi que nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, la protéine Myosine Va (MYO5A) permet le déplacement des mélanosomes sur les filaments d'actine. La protéine RAB27A se lie à la surface des mélanosomes et recrute la mélanophiline MLPH qui agit comme un lien entre le mélanosome et la protéine MYO5A liée au filament d'actine (Kuroda *et al.*, 2003; Ohbayashi et Fukuda, 2012). Ces trois protéines participent donc à la mobilité des mélanosomes. On comprend donc qu'une anomalie dans la structure de l'une de ces trois protéines lui empêchant de remplir sa fonction va désorganiser le transport des mélanosomes et donc la répartition de pigments. De fait une mutation à l'un de ces locus entraîne une répartition en amas des pigments le long du poil qui en diminuant l'absorption de la lumière contribue à donner à la robe un aspect dilué.

Une anomalie au locus *Mlph* est responsable de la robe *leaden* (grise) chez la souris par dilution du noir (Matesic *et al.*, 2001; Provance *et al.*, 2002). Chez le chat une délétion de *Ipb* causant un codon stop prématuré au locus *MLPH* est à l'origine des dilutions observées : la robe noire est diluée en bleu, le chocolat en lilas, le cannelle en faon et le roux en crème (Ishida *et al.*, 2006). *MLPH* est également impliqué dans la dilution de la robe chez le chien (Philipp *et al.*, 2005).

Chez les ânes gris, où l'on suspectait l'effet d'une dilution, l'observation, au microscope optique (Figure 54), n'a pas permis de mettre en évidence une réelle agrégation des mélanosomes en amas, bien qu'une répartition peu homogène par endroits ait été observée chez des ânes bai (Normands) et gris (Provinces).

Figure 54: Poils d'ânes vus au microscope optique (x40) montrant une répartition globalement homogène du pigment.
Photos : Legrand R. et Abitbol M. UMR955 (2012)



SLC45A2 et SLC36A1 : la famille des *solute carrier protein* contient plus de 300 membres impliqués dans le transport des protons et de certaines molécules. Il a été montré, chez la souris qu'une mutation au locus *Slc45a2*, aussi appelé *Matp* (*membrane-associated transporter protein*) était responsable du phénotype « underwhite » (Du et Fisher, 2002; Lehman *et al.*, 2000; Sweet *et al.*, 1998), une décoloration sévère de la robe (mutation *uw* récessive), mais d'autres mutations à ce locus sont responsables de dilutions moins marquées comme l'allèle *underwhite dominant brown Slc45a2^{Uw-dbr}* (mutation co-dominante) (Figure 55). Le même gène est responsable de la robe blanche du tigre du bengal (Xu *et al.*, 2013). Le mécanisme d'action de *SLC45A2* n'est pas parfaitement élucidé, mais la protéine joue un rôle dans la mélanogénèse en influant sur le pH des mélanosomes (Dooley *et al.*, 2013).

Figure 55: Photographie, à gauche d'une souris *underwhite* $Slc45a2^{Uw}/Slc45a2^{Uw}$ et d'une souris témoin $Slc45a2^{Uw}/+$. A droite une souris *underwhite dominant brown* $Slc45a2^{Uw-dbr}/Slc45a2^{Uw-dbr}$ et une hétérozygote $Slc45a2^{Uw-dbr}/+$. Le pelage des homozygotes *Uw-dbr* est beige clair sur le dos et plus clair sur le ventre, tandis que celui des hétérozygotes est brun foncé. (Mouse Genome Database Curatorial Staff, Images Obtained from the Mouse Locus Catalog, 2005, [<http://www.informatics.jax.org/>])



Chez le cheval une mutation dans l'exon 2 du gène *Matp* est associée à la robe crème (Mariat *et al.*, 2003) tandis qu'une mutation faux sens dans le gène *SLC36A1* est responsable de la dilution champagne (Cook *et al.*, 2008), ainsi que nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit.

Notons que d'autres études sur des protéines membres de la famille des *solute carrier* ont également montré un lien entre celles-ci et certaines robes diluées : une mutation dans *Slc24a5* est responsable du phénotype de souris *golden* (Ginger *et al.*, 2008; Lamason *et al.*, 2005; Schnetkamp, 2013) et dans *Slc7a11* de la robe de souris *subtle gray* (Chintala *et al.*, 2005)

RAB38 : la *Ras-related protein 38* ou RAB38 joue un rôle dans l'adressage de l'enzyme TYRP1 au mélanosome. Les mutants de souris présentent une robe chocolat (Figure 56) semblable à celle observée chez les mutants au locus *Tyrp1* (Loftus *et al.*, 2002).

Figure 56: Souris *Rab38* $+/+$ à gauche et *Rab38* *cht/cht* (*cht* : *chocolate*) à droite. (Loftus *et al.*, 2002)



DUN : comme nous l'avons vu dans la première partie du manuscrit, le locus *Dun* est responsable d'une dilution faisant apparaître la raie de mulet, la croix scapulaire et les zébrures sur les membres. Il serait également responsable d'une dilution de l'eumélanine et de la phéomélanine intéressant seulement le corps, sans toucher à la queue et à la crinière. La dilution Dun est un caractère dominant.

En 2003 Bricker *et al.* ont réalisé une étude d'association pour tenter de localiser le gène, étude qui fit l'objet d'une communication sans publication. Deux familles de chevaux furent étudiées en utilisant 85 marqueurs micro-satellites pour cribler leur génome. Les premiers résultats montrèrent une association de *Dun* à deux marqueurs du chromosome 8. Une inspection plus poussée du chromosome grâce à de nouveaux marqueurs du chromosome 8 et plus d'individus confirma cette localisation. La comparaison des cartes génétiques du cheval et de l'homme et de la souris ne leur permis cependant pas de proposer de gènes candidat. Aucune publication n'a eu lieu depuis (<http://www.vetmed.ucdavis.edu/index.cfm>).

Une recherche d'homologie, chez la souris, nous a permis de mettre en évidence la région homologue du chromosome 8 équin. Il s'agit d'une zone du chromosome 5 de souris dans laquelle nous avons identifié deux gènes candidats potentiels : *Vps33a* (*vacuolar protein sorting 33a*) aussi appelé locus *Buff* (bf) et *Bloc1s4* (*biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 subunit 4*). Ces deux gènes interviennent dans l'adressage des protéines et sont associés, dans des modèles de souris, à de l'hypopigmentation (Figure 57, Ciciotte *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003).

Figure 57: Hypopigmentation du mutant au locus *buff* (en bas) (Suzuki *et al.*, 2003).



LYST : Chez la souris le gène *Lyst* (*lysosomal trafficking regulator*), qui code une protéine impliquée dans le trafic des lysosomes, donne des mutants de couleur « beige » (Runkel *et al.*, 2006a)

KIT et KITL : Les mutants de souris pour le gène de la *tyrosin kinase receptor* (*Kit*) et son ligand (*Kitl*) présentent un phénotype avec des taches blanches. L'activation du récepteur c-kit mène à sa phosphorylation et à la transduction du signal. Ce signal est impliqué dans la survie, la différenciation et le fonctionnement normal de certaines cellules et joue un rôle majeur, notamment dans l'hématopoïèse et la pigmentation (Jordan et Jackson, 2000; Lennartsson et Rönnstrand, 2012; Mackenzie *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1996). Les gènes *Kit* et *Kitl* ont été associés, chez le cheval et les vaches Blanc Bleu Belge et Shorthorn, au phénotype rouan (Marklund *et al.*, 1999; Seitz *et al.*, 1999)

I.1.3 Gènes candidats pour le poil du Baudet du Poitou

FGF5 : de nombreux articles ont mis en évidence l'association entre le phénotype angora et des mutations du gène *FGF5* (*fibroblast growth factor 5*) comme chez la souris où une délétion de 2 kb a été mise en évidence (Hébert *et al.*, 1994; Sundberg *et al.*, 1997), chez le chien ou une mutation faux-sens a été identifiée chez les animaux à poils longs (Housley et Venta, 2006) et chez le chat où quatre mutations dans *FGF5* ont été associées au phénotype poil-long (Drögemüller *et al.*, 2007; Kehler *et al.*, 2007).






Chez les mammifères, la croissance du poil est sous l'influence de nombreux effecteurs comme le *tumor growth factor α* , les *epidermal growth factors*, l'*insulin-like growth factor-1* et certains *fibroblast growth factors* (FGF). La famille des FGF comprend au moins 19 protéines possédant divers propriétés biologiques, parmi lesquelles on trouve FGF5 associé à la pousse du poil. Hébert *et al.*, (1994) ont en effet montré que chez la souris la délétion de *Fgf5* prolongeait anormalement la croissance du poil tandis qu'une autre étude a montré que le récepteur de FGF5 était exprimé au niveau de la papille dermique du poil (Rosenquist et Martin, 1996). Chez la souris, il a été montré que le gène *Fgf5* était transcrit en deux protéines : la forme longue FGF-5 et une forme courte FGF-5S, cette dernière étant amputée de l'exon 2 et d'une grande partie de l'exon 3. Dans leur étude Suzuki *et al.*, (2000) ont montré que FGF-5S et FGF-5 étaient exprimés spécifiquement en fin de phase anagène (synthèse du poil), mais que les concentrations en FGF-5S diminuaient ensuite rapidement avant le passage en phase catagène (régression du follicule pileux). Ils ont également montré que FGF-5S n'avait pas d'activité seule mais permettait d'inhiber l'action de FGF-5, véritable responsable du passage en phase catagène. Ainsi, l'inactivation du gène *fgf-5* entraîne l'absence de production de FGF-5, protéine nécessaire au passage du poil en phase catagène : il n'y a donc plus de chute de poil mais au contraire une pousse continue.

KRT71 et RSPO2 : chez la souris, deux mutations faux sens dans le gène *Krt71* (*keratine-71*) ont été associées avec un phénotype « poils ondulés/vibrisses bouclées » (Runkel *et al.*, 2006b). De même, chez le chat, un variant de *KRT71* est associé au phénotype « poils bouclés » chez le Selkirk Rex (Gandolfi *et al.*, 2013).

Chez le chien des variants pour ce locus et pour *FGF5* et *RSPO2* (*R-spondin-2*) ont été associés avec divers phénotypes de poils (Cadieu *et al.*, 2009).

Comme le montre la Figure 58, la combinaison des allèles de ces trois gènes crée sept phénotypes de texture de robe différents. Les signes (+) indique la présence d'un variant tandis que le signe (-) indique le caractère sauvage. Une race caractéristique de chacune des combinaisons observée dans l'étude est présentée.

Figure 58: Phénotypes de pelage observés chez le chien en fonction des différents allèles à chacun des trois gènes *FGF5*, *RSPO2* et *KRT71* impliqués. Le signes (+) indique la présence d'un variant tandis que le signe (-) indique le caractère sauvage (Cadiou *et al.*, 2009).

PHENOTYPE	<i>FGF5</i>	<i>RSPO2</i>	<i>KRT71</i>	A Basset Hound	B Australian Terrier	C Airedale Terrier
A Court	-	-	-			
B Dur	-	+	-			
C Dur et bouclé	-	+	+			
D Long	+	-	-			
E Long et fourni	+	+	-			
F Bouclé	+	-	+			
G Bouclé et fourni	+	+	+			

Le gène *KRT71* code une kératine du poil alors que *RSPO2* code une protéine impliquée dans la genèse de follicules pileux (Cadiou *et al.*, 2009).

Ainsi, parmi les trois gènes *FGF5*, *RSPO2* et *KRT71* impliqués dans la texture du pelage, le gène candidat le plus évident pour le poil long du Baudet du Poitou est le gène *FGF5*.

Le Tableau 14 regroupe par ordre alphabétique les gènes candidats que nous avons retenus pour l'étude moléculaire du déterminisme de la couleur et de la texture de la robe chez les principales races asines françaises.

Tableau 14: Gènes candidats retenus pour l'étude

Gène	Structure	Fonction	Espèces concernées	Candidature pour le phénotype...	Références
<i>ASIP</i>	3 Exons	Ligand du récepteur MC1R. Régulation de la production de l'eumélanine/ phéomélanine	Cheval, Souris, Chien, Lapin	Noir	(Bultman <i>et al.</i> , 1994, 1992; Candille <i>et al.</i> , 2007; Fontanesi <i>et al.</i> , 2010; Rieder <i>et al.</i> , 2001)

<i>BLOC154</i>	2 Exons	Adressage des protéines	Souris	Gris	(Ciciotte <i>et al.</i> , 2003)
<i>BD103</i>	2 Exons	Protéine Ligand du récepteur MC1R. Régulation de la production de l'eumélanine/ phéomélanine	Chien	Noir	(Candille <i>et al.</i> , 2007)
<i>DCT=TYRP2</i>	8 Exons	Synthèse des mélanines	Souris	Bai/Chocolat	(Guyonneau <i>et al.</i> , 2004)
<i>FGF5</i>	3 Exons	Régulation de la croissance du poil	Souris, chien, chat	Poil long	(Drögemüller <i>et al.</i> , 2007; Hébert <i>et al.</i> , 1994; Housley et Venta, 2006; Kehler <i>et al.</i> , 2007; Sundberg <i>et al.</i> , 1997)
<i>KITL</i>	8 Exons	Récepteur de la protéine KIT, régulation du développement	Souris, cheval, vache	Gris	(Marklund <i>et al.</i> , 1999; Seitz <i>et al.</i> , 1999)
<i>MC1R</i>	1 Exon	Régulation de la production de l'eumélanine/ phéomélanine	Cheval, chien, renard, souris, mouton	Noir	(Rieder <i>et al.</i> , 2001; Robbins <i>et al.</i> , 1993; Schmutz <i>et al.</i> , 2002; Våge <i>et al.</i> , 1999, 1997)
<i>MLPH, RAB27 et MYO5</i>	16 Exons, 6 Exons et 44 Exons respectivement	Mobilité des mélanosomes dans le mélanocyte	Souris, chat, chien	Gris	(Ishida <i>et al.</i> , 2006; Matesic <i>et al.</i> , 2001; Philipp <i>et al.</i> , 2005; Provance <i>et al.</i> , 2002)
<i>PMEL17</i>	11 Exons	Régulation de la maturation des mélanosomes	Souris, vache, chien, cheval	Gris	(Brunberg <i>et al.</i> , 2006; Clark <i>et al.</i> , 2008; Kwon <i>et al.</i> , 1995; Schmutz et Dreger, 2013)

TYR	5 Exons	Synthèse des mélanines	Souris, chien, chat, lapin, vache	Bai/Chocolat	(Aigner <i>et al.</i> , 2000; L A Lyons <i>et al.</i> , 2005; Rieder <i>et al.</i> , 2001; Schmidt-Küntzel <i>et al.</i> , 2005; Schmutz <i>et al.</i> , 2004; Yokoyama <i>et al.</i> , 1990)
TYRP1	7 Exons	Synthèse des mélanines	Souris, chien, chat	Bai/Chocolat	(Leslie A Lyons <i>et al.</i> , 2005; Schmidt-Küntzel <i>et al.</i> , 2005; Schmutz <i>et al.</i> , 2002; Zdarsky <i>et al.</i> , 1990)
VPS33	13 Exons	Adressage des protéines	Souris	Gris	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003)

I.2 Méthodologie d'analyse des séquences

Après réception des séquences générées par le laboratoire GATC, nous avons procédé à un examen visuel des chromatogrammes afin de repérer la présence de doubles pics qui trahissent une hétérozygotie (Figure 59), ou un décalage suite à une délétion visible sur les animaux hétérozygotes (Figure 60).

Figure 59 : Présence d'un double pic avec hétérozygotie A/G en position 324

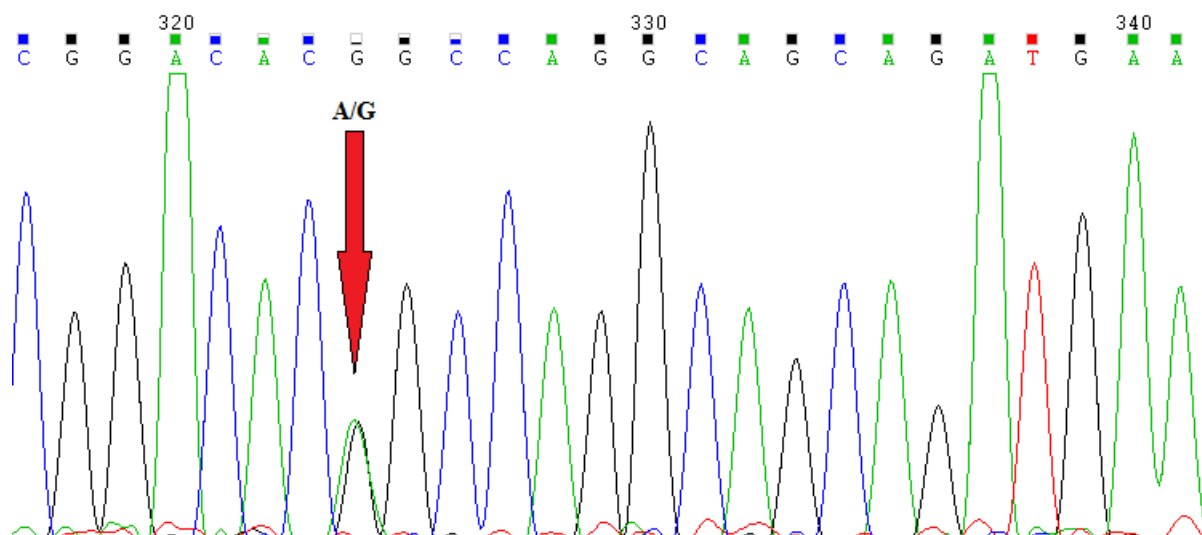
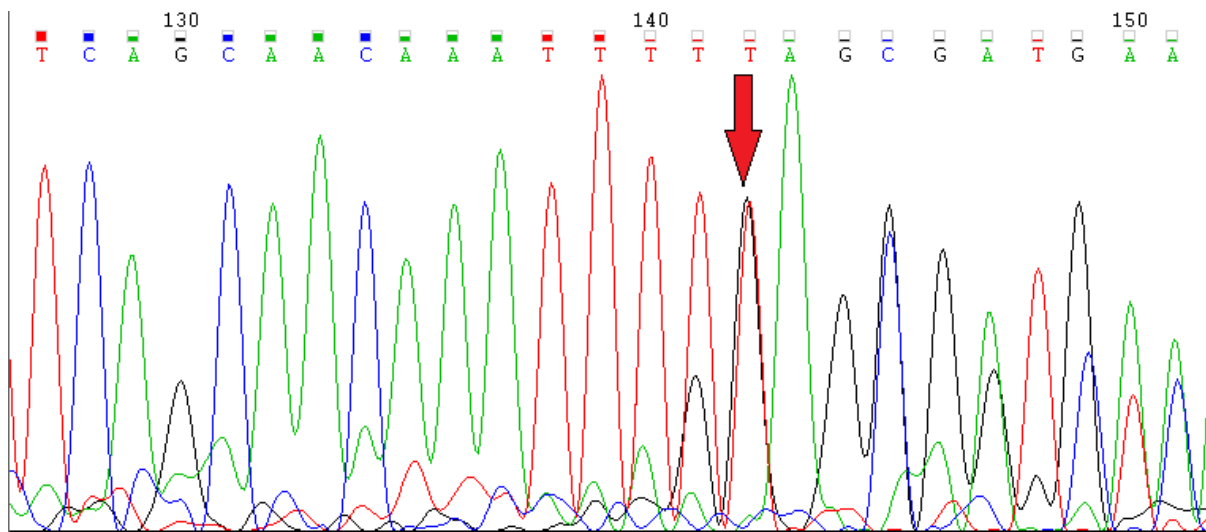
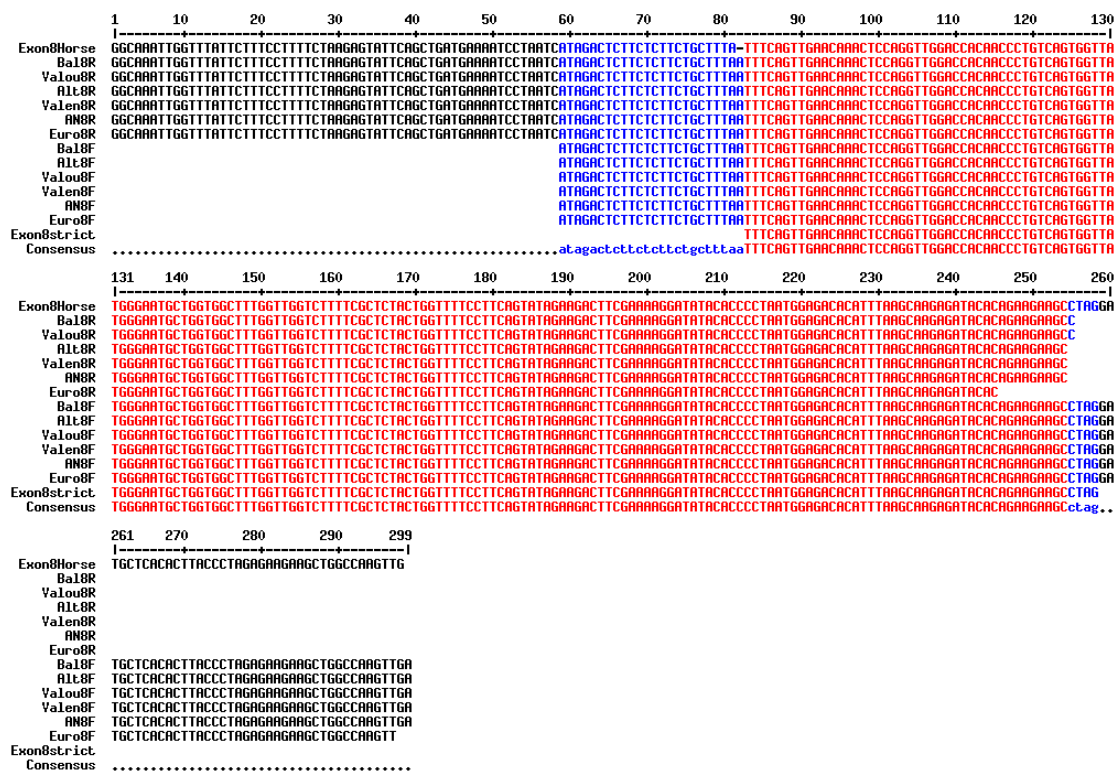


Figure 60: Décalage suite à une délétion en position 142 chez un animal hétérozygote entraînant des doubles pics par la suite.



Nous avons également réalisé la correction manuelle des séquences envoyées par GATC lorsque le chromatogramme n'est pas en accord avec la séquence texte produite. Une fois ces deux étapes réalisées, nous avons procédé à l'alignement des séquences entre les individus à l'aide du logiciel Multalin (Figure 61) :

Figure 61: Alignement de séquences. Les séquences identiques à 90% apparaissent en rouge, celles où la concordance est comprise entre 50 et 90% en bleu, les autres en noir.



Par défaut, pour les séquences analysées, les résultats de deux ânes bais (Normands), deux ânes noirs (Pyrénées) et deux ânes gris (Provençaux) ont été comparés. Dans de nombreux cas deux ânes noirs (Berry) ont été ajoutés ainsi que parfois d'autres ânes ou chevaux complémentaires. Pour chaque gène, le nombre total d'animaux séquencés sera indiqué.

I.2.1 Gènes candidats pour la couleur de robe Noir/Bai

I.2.1.A *ASIP*

Pour ce gène, huit ânes ont été séquencés (2 Normands, 2 Pyrénées, 2 Berry, 2 Provence) ainsi que deux chevaux noirs et un cheval bai.

Le gène *ASIP* du cheval comporte trois exons codants. Les PCR des trois exons connus chez le cheval ont montré des amplifications de longueur attendue chez les ânes. Nous n'avons observé aucune variation de séquence entre le cheval et les ânes pour l'exon 1.

Nous avons observé dans l'exon 2 chez les deux chevaux noirs la délétion de 11pb responsable chez le cheval de la robe noire. Aucun des ânes analysés ne présentait de mutation dans cet exon.

Enfin dans l'exon 3 il existait un SNP synonyme entre ânes (pas de changement d'acide aminé dans la protéine) et non associé à la couleur. Dans la région 3'UTR et la région non codante en aval de l'exon 3 nous avons identifié sept SNP entre cheval et ânes et un SNP entre ânes, non associé à la couleur.

Le résultat du séquençage du gène *ASIP* est présenté dans le Tableau 15.

Tableau 15: Variations de séquence identifiées dans le gène *ASIP* chez les ânes

Gène <i>ASIP</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	-	-	-
Intron 1	-	-	-
Exon 2	-	-	-
Intron 2	-	-	-
Exon 3	-	C117R non associé	-
3'UTR et aval	7	2 non associés	-

Ces résultats permettent de conclure qu'il n'y avait pas de mutation associée au phénotype noir/bai dans la phase codante d'*ASIP*. Cependant, d'autres séquences modifiées dans le gène pourraient être en mesure d'influer sur son expression, en effet :

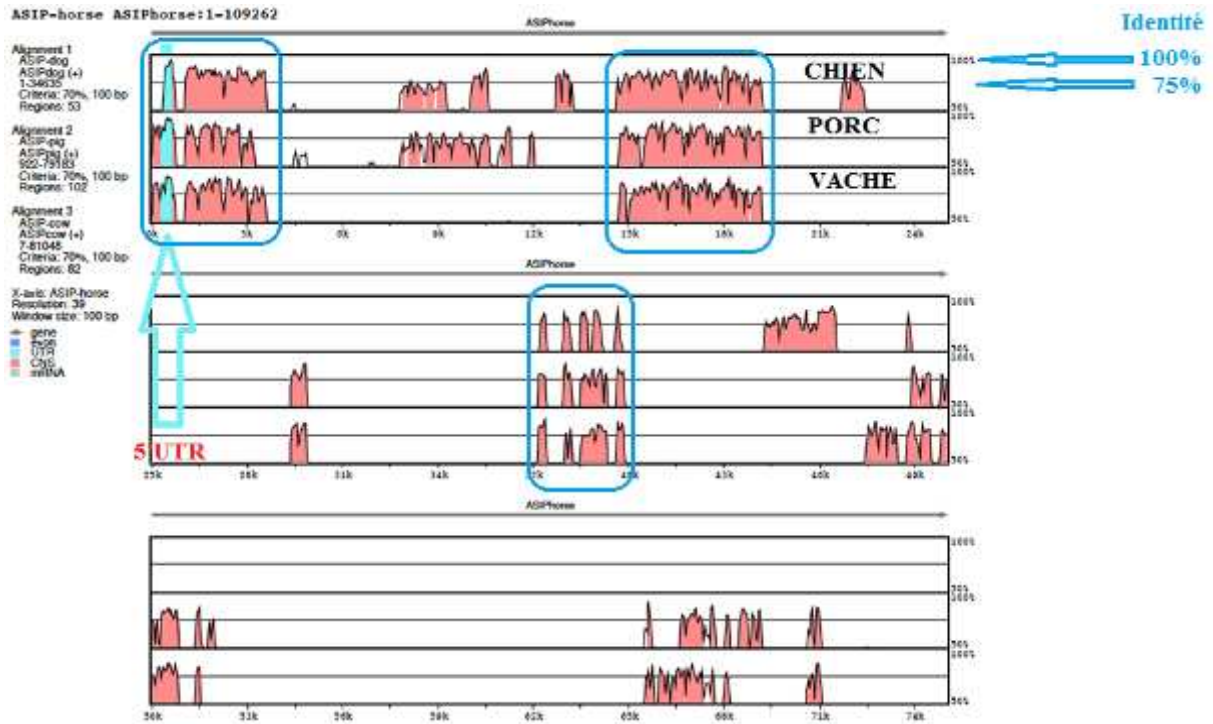
- Il existe un exon 1 non traduit (5'UTR),
- L'intron 1 de très grande taille (109kb chez le cheval) contient de très nombreuses séquences régulatrices

Ces observations nous ont amenées à réaliser une exploration du 5'UTR (exon 1 non traduit) et d'une partie de l'intron 1.

Pour cela nous avons utilisé le logiciel BLAST pour trouver les séquences équivalentes au 5'UTR du cheval dans les génomes du chien, du porc et de la vache.

Nous avons ensuite utilisé le logiciel VISTA pour identifier les séquences les plus conservées entre ces espèces et qui avaient donc le plus de chance d'être régulatrices. Comme on le voit sur la Figure 62, certaines séquences sont conservées à plus de 80% (encadrées en bleu) entre le cheval qui constitue la référence, et les trois autres mammifères que sont le chien, le porc et la vache. Ce sont parmi ces séquences très conservées que nous avons effectué des séquençages.

Figure 62: Comparaison et l'homologie des séquences entre le cheval, le chien, le porc et la vache pour la partie 5'UTR du gène ASIP. Les pics de couleur indiquent les régions homologues à plus de 75% entre le cheval (séquence de référence) et le chien (au dessus), le porc (au milieu) et la vache (en bas). Trois régions principales encadrées en bleu étaient fortement conservées entre les quatre espèces.



Nous nous sommes intéressés au premier bloc très conservé qui comprenait le 5'UTR. Ce bloc faisant près de 3300 paires de bases, nous avons choisi cinq portions non chevauchantes conservées à plus de 80% en nous basant sur la comparaison entre le génome du cheval et celui de la vache, chez qui l'homologie était la moins forte. Les résultats étaient les suivants :

- Portion 1 : identification de six SNP entre les ânes et le cheval,
- Portion 2 : identification d'un SNP entre les ânes et le cheval,
- Portion 3 : identification de neuf SNP entre les ânes et le cheval,
- Portion 4 : identification de deux SNP entre ânes et le cheval, présence d'une insertion de 10pb chez tous les ânes par rapport au cheval, présence d'un SNP entre ânes (un âne de Provence était hétérozygote seulement),
- Portion 5: identification de quatre SNP entre les ânes et le cheval.

Aucune mutation liée à la couleur n'a donc pu être identifiée, et l'on a constaté que cette région de l'intron 1 d'*ASIP* était extrêmement conservée entre âne et cheval.

Enfin nous avons réalisé une étude d'expression d'*ASIP* en RT-PCR (Figure 63). Les résultats semblaient indiquer une différence d'expression entre les ânes Normands, un Baudet du Poitou et un âne des Pyrénées.

**Figure 63: Etude d'expression d'ASIP en RT-PCR semblant montrer une différence d'expression entre deux ânes Normands, deux Baudets du Poitou et un âne des Pyrénées. A gauche GAPDH (gène codant pour la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est un gène ubiquitaire servant de témoin positif à la réaction.
NOR : Normand BDP : Baudet du Poitou PYR : Pyrénées**



Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 1 à Annexe 7.

I.2.1.B *MC1R*

En raison de sa taille importante de 1079 paires de bases chez le cheval en un seul exon, *MC1R* a été séquencé en deux parties dont nous avons par la suite vérifié le bon chevauchement. Pour ce gène, huit ânes ont été séquencés (2 Normands, 2 Pyrénées, 2 Berry, 2 Provence) ainsi qu'un cheval bai et un cheval alezan.

La phase codante comportait sept SNP entre le cheval et les ânes, tous silencieux et deux SNP entre ânes, dont l'un était synonyme et non associés à la couleur et l'autre non synonyme (M210T). Un âne de Provence (gris) et un âne des Pyrénées (noir) analysés étaient hétérozygote C/T pour ce SNP (Tableau 16).

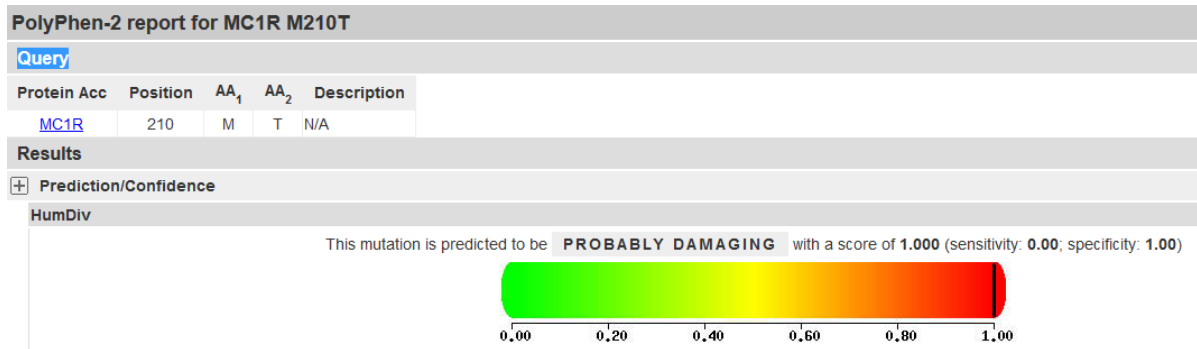
Tableau 16: Variations de séquence identifiées dans le gène *MC1R* chez les ânes

Gène <i>MC1R</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Amont exon	-	-	-
Exon	7 synonymes	1 synonyme et non associé 1 C/T non synonyme (2 ânes hétérozygotes)	-

Aval exon	-	-	-
-----------	---	---	---

Ce SNP conduisait au remplacement d'une méthionine par une thréonine en position 210 dans la protéine MC1R, une mutation annoncée par le logiciel PolyPhen, qui compare les bases de données de mutations et leurs effets déjà connus, comme très probablement délétère avec un score de 1 sur 1.

Figure 64: Prédiction des effets du SNP du gène *MC1R* montrant un impact majeure de la mutation M210T (POLYPHEN-2)



Les six autres ânes séquencés (un Provence, deux Normands, un Pyrénées, deux Berry) étaient homozygotes T/T, alors que l'allèle T constitue la séquence de référence chez le cheval (Ensembl).

Ainsi le séquençage de *MC1R* n'a pas permis de mettre en évidence de variation associée à la couleur dans la phase codante.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 8 à 9.

I.2.1.C *TYRP1*

Pour ce gène, huit ânes et un cheval contrôle ont été séquencés (2 Normands, 2 Pyrénées, 2 Berry, 2 Provence et un cheval bai-brun). Lors du séquençage de *TYRP1* nous avons pu mettre en évidence la présence de 17 SNP (silencieux dans la phase codante) entre cheval et ânes et sept SNP entre ânes dont quatre non associés et/ou synonymes (Tableau 17).

Tableau 17: Variations de séquence identifiées dans le gène *TYRP1* chez les ânes

Gène <i>TYRP1</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	5	3 (voir tableau suivant)	-
Intron 1	1	-	-
Exon 2	4	-	-
Intron 2	-	1 non associé	-
Exon 3	-	-	-
Intron 3	-	1 non associé	-

Exon 4	-	1 synonyme et non associé	-
Exon 5	-	-	-
Exon 6	2	-	-
Intron 6	2	-	
Exon 7	3	1 synonyme et non associé	-
3'UTR	-	1	-

Trois des SNP entre ânes étaient non synonymes dans l'exon 1 : le SNP1 G/A provoquait un changement de codon GTT en ATT ce qui transformait le 39^{ème} acide aminé d'une Valine en une Isoleucine. Le SNP2 G/T provoquait un changement de codon CGG en CTG ce qui transformait le 70^{ème} acide aminé d'une Arginine en une Leucine. Le SNP3 T/C provoquait un changement de codon GTG en GCG ce qui transformait le 74^{ème} acide aminé d'une Valine en une Alanine (Tableau 18).

Tableau 18: Génotypes pour les trois SNP non synonymes de l'exon 1 du gène *TYRP1*.

	SNP1 (V39I)	SNP2 (R70L)	SNP3 (V74A)
Normand 1 (bai)	G/G	G/T	C/T
Normand 2 (bai)	G/G	G/T	C/T
Pyrénées 1 (noir)	G/G	G/T	T/T
Pyrénées 2 (noir)	G/G	G/G	C/T
Berry 1 (noir)	G/G	T/T	T/T
Berry 2 (noir)	G/A	G/T	C/T
Provence 1 (gris)	G/G	G/T	T/T
Provence 2 (gris)	G/G	T/T	T/T
Cheval bai brun	G/G	G/G	T/T
Cheval (Ensembl)	G	G	T
Conséquence	Valine 39 Isoleucine	Arginine 70 Leucine	Valine 74 Alanine

Afin de connaître l'importance de ces mutations sur la protéine finale nous avons utilisé le programme PolyPhen qui compare les bases de données de mutations et leurs effets déjà connus (Figure 65). Les SNP1 et 3 ne semblaient pas avoir de conséquences tandis que le SNP2 était considéré comme ayant probablement un effet délétère (Figure 65).

Figure 65 : Prédiction des effets des 3 SNP de l'exon 1 du gène *TYRP1* montrant une absence d'impact des mutations V39I et V74A ainsi qu'un impact modéré de la mutation R70L (POLYPHEN-2)



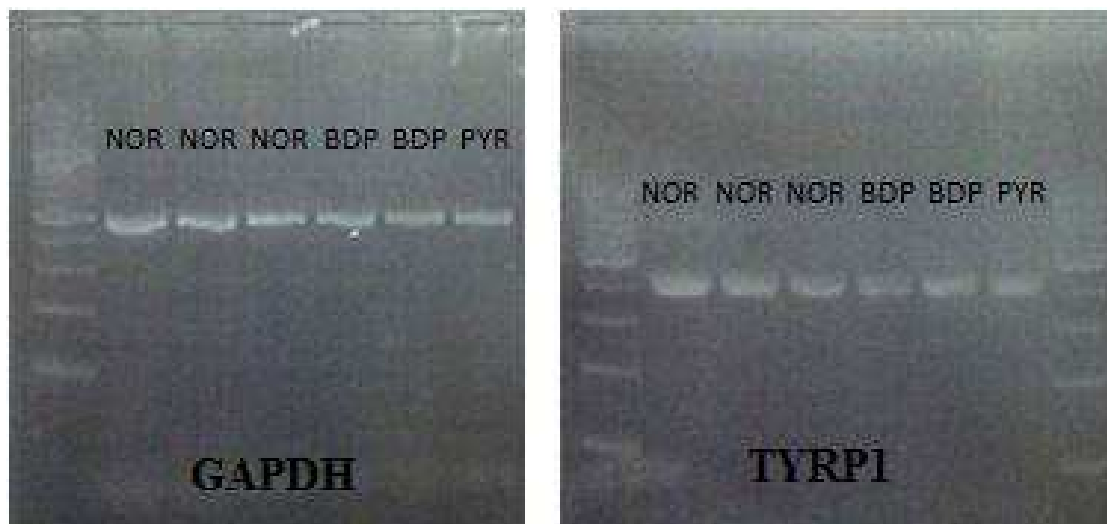
Nous avons également trouvé dans le 3'UTR un SNP entre ânes possiblement associé à la couleur de la robe (Tableau 19)

Tableau 19 : Génotypes pour le SNP situé dans le 3'UTR du gène *TYRP1*.

	SNP situé dans le 3' UTR de <i>TYRP1</i>
Normand 1 (bai)	A/A
Normand 2 (bai)	A/A
Pyénées 1 (noir)	A/G
Pyénées 2 (noir)	A/G
Cheval noir	A/A
Cheval bai-brun	A/A
Cheval (Ensembl)	A

Ces résultats nous ont mené à réaliser une étude d'expression du gène *TYRP1* par RT-PCR sur des ARN extraits de biopsies de peau (Figure 66). L'analyse en RT-PCR ne semblait pas mettre en évidence de différence de niveau d'expression de *TYRP1* entre les différentes races.

Figure 66 : Etude d'expression de *TYRP1* en RT-PCR ne montrant pas de différence entre les différentes races.
 A gauche *GAPDH* est un gène ubiquitaire servant de témoin.
 NOR : Normand BDP : Baudet du Poitou PYR : Pyrénées



A l'issue de l'étude de *TYRP1*, il ne semblait donc pas y avoir de mutation associée à la couleur.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 10 à Annexe 16.

I.2.1.D *DCT* ou *TYRP2*

Pour le gène *DCT* qui comporte 8 exons chez le cheval, nous avons trouvé de nombreux SNP dans les phases codante et non codante : 17 SNP silencieux entre ânes et chevaux et 3 SNP entre ânes, non associés à la couleur. Pour ce gène, six ânes ont été séquencés : 2 Normands (bais), 2 Pyrénées (noirs) et 2 Provençes (gris) Les résultats sont présentés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Variations de séquence identifiées dans le gène *DCT* chez les ânes

Gène <i>DCT</i> = <i>TYRP2</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	3	1 non associé	-
Intron 1	1	1 non associé	-
Exon 2	2 synonymes	-	-
Exon 3	1 synonyme	-	-
Intron 3	3	1 non associé	-
Exon 4	1 synonyme	-	-
Exon 5	1 synonyme	-	-
Intron 5	1	-	-
Exon 6	4 synonymes	-	-

Exon 7	-	-	-
Exon 8	-	-	-

Ainsi le séquençage de *DCT* n'a pas permis de mettre en évidence de variation associée à la couleur dans la phase codante de ce gène.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 17 à Annexe 23.

I.2.1.E *BD103* (β-Défensine)

Le gène de la β-Défensine compte 2 exons chez le cheval. Pour ce gène, nous avons séquencé huit ânes (2 Normands, 2 Pyrénées, 2 Berry et 2 Provence) ainsi qu'un cheval noir. Nous avons trouvé un SNP en amont du 1^{er} exon entre cheval et ânes non associé à la couleur et un autre SNP entre ânes également non associé à la couleur. Dans l'exon 1 il existait un SNP entre cheval et ânes, silencieux (synonyme). Dans l'intron 1 non entièrement séquencé, il existait deux SNP après l'exon 1 et trois SNP avant l'exon 2 entre cheval et ânes, tous silencieux, et un SNP entre ânes non associé à la couleur. De plus il existait une délétion de 4pb entre les séquences obtenues chez le cheval noir ainsi que la séquence de référence équine (Ensembl) et les huit ânes testés. Dans l'exon 2 nous avons trouvé un SNP entre ânes synonyme et non associé à la couleur (Tableau 21).

Tableau 21 : Variations de séquence identifiées dans le gène de la *beta-defensin 103* chez les ânes

Gène <i>BD103</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Amont 1 ^{er} exon	1	1 non associé	-
Exon 1	1 synonyme	-	-
Intron 1	2 + 3	1 non associé	Délétion de 4pb entre les ânes et le cheval
Exon 2	-	1 synonyme et non associé	-
Intron 2	-	-	-

Ainsi le séquençage de *CBD103* n'a pas permis de mettre en évidence de variation associée à la couleur de la robe dans la phase codante de ce gène.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 24 et 25.

I.2.2 Gènes candidats pour la couleur de robe Grise

I.2.2.A *PMEL17*

Pour ce gène, nous avons séquencé six ânes (2 Normands, 2 Pyrénées et 2 Provence). Le gène *PMEL17* compte 11 exons chez le cheval, parmi lesquels nous avons identifié 14 SNP entre cheval et ânes, dont un était une mutation faux sens T547A dans l'exon 9 (une thréonine en position 547 remplacée par une alanine), et 10 SNP entre ânes dont trois dans l'exon 2 et un dans l'exon 11 possiblement associés à la couleur de la robe. En outre il existait une délétion de 3 pb dans l'intron 10 chez certains ânes (Tableau 24).

Tableau 22: Variations de séquence identifiées dans le gène *PMEL17* chez les ânes. Del : délétion.

Gène <i>PMEL17</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	1	-	-
Intron 1	-	-	-
Exon 2	-	3 (voir Tableau 23)	-
Intron 2	2	-	-
Exon 3	-	-	-
Exon 4	2	-	-
Intron 4	1	1 non associé	-
Exon 5	-	1 synonyme et non associé	-
Intron 5	-	1	-
Exon 6	4	1	-
Exon 7	-	-	-
Intron 7	1	1 non associé	-
Exon 8	-	-	-
Exon 9	T547A	-	
Intron 9	1	1	
Exon 10	-	-	
Intron 10	1	-	Del 3 pb
Exon 11	-	1 (voir Tableau 24)	-

Nous nous sommes donc intéressés aux SNP de l'exon 2 (Tableau 23).

Tableau 23: Génotypes pour les trois SNP de l'exon 2 du gène *PMEL17*.

	SNP1 (R33Q)	SNP2 (L42F)	SNP3 (synonyme)
Normand 1 (bai)	G/G	C/C	C/C
Normand 2 (bai)	G/G	C/C	C/C
Pyrénées 1 (noir)	G/A	C/T	C/C
Pyrénées 2 (noir)	A/A	T/T	C/C
Provence 1 (gris)	A/A	T/T	C/C
Provence 2 (gris)	G/A	C/T	C/T
Cheval Ensembl	G	C	C
Conséquence	Arginine 33 Glycine	Leucine 42 Phénylalanine	Synonyme

On constate que les ânes bails se distinguaient des ânes noirs et gris pour les deux non synonymes.

L'étude de l'impact des deux mutations R33Q et L42F par le logiciel Polyphen a donné les résultats suivants (Figure 67). La première mutation ne semblait pas avoir d'effet, tandis que la seconde avait vraisemblablement un impact modéré sur la protéine (Figure 67).

Figure 67: Etude par Polyphen de deux mutations de l'exon 2 du gène *PMEL17* montrant aucun impact de la mutation R33Q sur la protéine et un effet modéré de la mutation L42F.



Nous avons ensuite étudié le SNP entre ânes situé dans l'exon 11 et possiblement associé à la couleur de la robe, ainsi que la délétion de 3 pb située dans l'intron 10 et qui précédait d'une dizaine de bases l'exon 11 (Tableau 24).

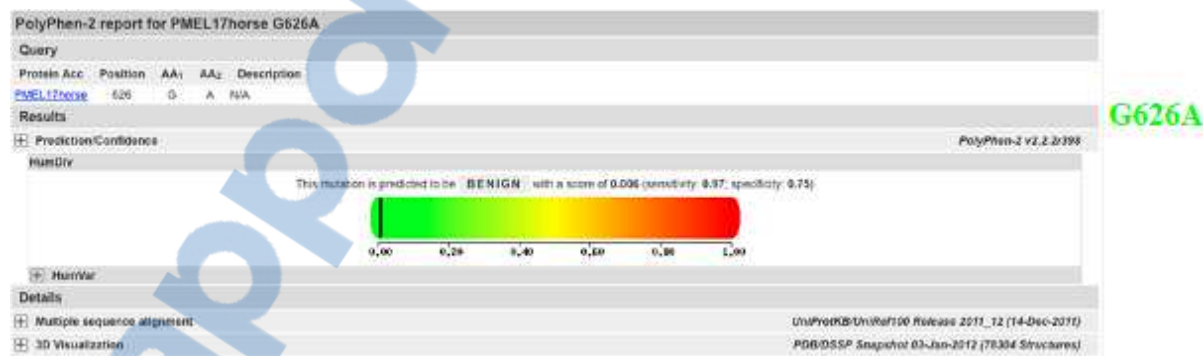
Pour un des ânes les résultats n'ont pas permis de conclure sur la délétion et le SNP.

Tableau 24: Génotypes pour les variations de séquence de l'intron 10 et de l'exon 11 du gène *PMEL17*. N : pas de délétion. Del : délétion.

	Del 3pb intron 10	SNP exon 11 (G626A)
Normand 1 (bai)	N/N	G/G
Normand 2 (bai)	N/N	G/G
Pyrénées 1 (noir)	?	?
Pyrénées 2 (noir)	N/del	C/C
Provence 1 (gris)	N/del	C/C
Provence 2 (gris)	del/del	C/C
Cheval Ensembl	N	G
Conséquence	?	Glycine 626 Alanine

L'étude par le logiciel Polyphen de la mutation G626A a montré qu'elle était sans incidence sur la protéine (Figure 68).

Figure 68: Etude par Polyphen de la mutation de l'exon 11 du gène *PMEL17* montrant aucun impact de cette mutation G626A sur la protéine.



En conclusion : l'étude de *PMEL17* n'a pas permis de mettre en évidence l'existence d'une association entre une mutation et une variation de couleur de la robe, cependant, deux SNP dans l'exon 2, un SNP dans l'exon 11 et une délétion de 3 pb dans l'intron 10 semblaient être présents différemment chez les ânes Normands (bais) d'une part et les ânes Pyrénéens et les Provinces d'autre part.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 26 à Annexe 32.

I.2.2.B *RAB27*

Pour ce gène, nous avons séquencé six ânes (2 Normands, 2 Pyrénées, 2 Provinces). L'étude de *RAB27*, qui comporte 6 exons chez le cheval, a permis de mettre en évidence 10 SNP entre cheval et ânes, tous synonymes lorsqu'ils étaient dans la partie codante, et un SNP entre ânes non associé à la couleur de la robe (Tableau 25).

Tableau 25: Variations de séquence identifiées dans le gène *RAB27* chez les ânes

Gène <i>RAB27</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1 (5'UTR)	Non analysé	Non analysé	Non analysé
Intron 1	3	-	-
Exon 2	-	-	-
Intron 2	1	1 (non associé)	-
Exon 3	1 synonyme	-	-
Intron 3	1	-	-
Exon 4	-	-	-
Intron 4	1	-	-
Exon 5	-	-	-
Intron 5	2	-	-
Exon 6	1, E207A	-	-

Ainsi le séquençage de *RAB27* n'a pas permis de mettre en évidence de variation associée à la couleur de la robe, dans la phase codante de ce gène.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 33 à Annexe 37.

I.2.2.C *KITL*

Pour ce gène, nous avons séquencé six ânes (2 Normands, 2 Pyrénées et 2 Provinces). L'étude des 8 exons de *KITL* n'a pas mis en évidence de variation associée à la couleur. Il existait 12 SNP entre le cheval et les ânes, dont un seul dans la phase codante (silencieux), et un SNP (non associé à la couleur de robe) entre ânes dans l'intron 1 (Tableau 26).

Tableau 26: Variations de séquence identifiées dans le gène *KITL* chez les ânes

Gène <i>KITL</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	-	-	-
Intron 1	3	1 non associé	-
Exon 2	-	-	-
Exon 3	1 synonyme	-	-
Exon 4	-	-	-
Intron 4	8	-	-
Exon 5	-	-	-
Exon 6	-	-	-
Exon 7	-	-	-
Exon 8	-	-	-

Ainsi le séquençage de *KITL* n'a pas permis de mettre en évidence de variation associée à la couleur de la robe dans la phase codante du gène.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 38 à Annexe 45.

I.2.2.D *VPS33a* (candidat *Dun*)

Pour ce gène, nous avons séquencé six ânes (2 Normands, 2 Pyrénées, 2 Provence).
Le séquençage des 13 exons de *VPS33a* a donné les résultats présentés dans le Tableau 27.

Tableau 27: Variations de séquence identifiées dans le gène *VPS33a* chez les ânes. Del : délétion.

Gène <i>VPS33a</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	-	-	Del 1 pb
Intron 1	1	-	-
Exon 2	1 (synonyme)	-	-
Intron 2	-	1 non associé	Del 1 pb
Exon 3	-	-	-
Intron 3	-	-	-
Exon 4	-	-	-
Intron 4	-	-	Insertion 16 pb
Exon 5	Non analysé	Non analysé	Non analysé
Intron 5	-	-	-
Exon 6	-	-	-
Intron 6	-	-	Del 2 pb
Exon 7	2 synonymes	-	-
Intron 7	-	-	-
Exon 8	-	-	-
Intron 8	-	-	-
Exon 9	-	-	-
Intron 9	-	-	-
Exon 10	-	-	-
Intron 10	2	1 non associé	-
Exon 11	1 synonyme	1 synonyme, non associé	-
Intron 11	1	1 non associé	-
Exon 12	-	-	-
Intron 12	-	-	Del 5 pb
Exon 13	-	-	-

Exon 13 3'UTR	-	-	Insertion 3 pb
---------------	---	---	----------------

Le gène contenait quatre SNP entre cheval et ânes, et quatre autres SNP entre ânes, tous non associés à la couleur de la robe. Il contenait également au moins une délétion d'une pb dans l'intron 2, une délétion de 2 pb dans l'intron 6, une délétion de 5 pb dans l'intron 12, une insertion de 16 pb dans l'intron 4 et une insertion de 3 pb dans le 3'UTR, présentes chez tous les six ânes analysés, comparés à la séquence de référence du cheval.

Ainsi le séquençage de *VPS33a* n'a pas permis de mettre en évidence de variation associée à la couleur de la robe, dans la phase codante de ce gène. Notons cependant que le séquençage du gène reste incomplet (manque l'exon 5).

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 46 à Annexe 57.

I.2.2.E *MLPH*

Pour ce gène, nous avons séquençé 6 ânes (2 Normands, 2 Berry, 2 Provence). Le séquençage de *MLPH* a donné les résultats présentés dans le Tableau 28 :

Tableau 28: Variations de séquence identifiées dans le gène *MLPH* chez les ânes.

Gène <i>MLPH</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	-	-	-
Intron 1	5	-	-
Exon 2	-	-	-
Intron 2	1	2 non associés	-
Exon 3	1 synonyme	1 synonyme non associé	-
Intron 3	1	-	Insertion 2pb
Exon 4	2 synonymes et A148T	-	-
Intron 4	1	3 non associés	Insertion 1pb
Exon 5	1 synonyme et A152Q, R153P, N163S	-	-
Intron 5	4	-	Insertion 15pb avec 2 SNP entre ânes non associés
Exon 6	2 synonymes et G193D	-	-
Intron 6	4	1 non associé	-
Exon 7	I232T, N258D,	-	-

	A290G		
Intron 7	2	1 non associé	-
Exon 8	1 synonyme et P335L	-	-
Intron 8	1	-	Insertion d'une pb
Exon 9	L348S	R352H non associé	-
Intron 9	-	1 non associé	-
Exon 10	Non analysé	Non analysé	Non analysé
Intron 10	Non analysé	Non analysé	Non analysé
Exon 11	Non analysé	Non analysé	Non analysé
Intron 11	1	-	-
Exon 12	2 synonymes	1 synonyme, non associé	-
Intron 12	-	1 non associé	-
Exon 13	L534S	-	-
Intron 13	-	-	Insertion de 5 pb juste en amont de l'exon 14
Exon 14	-	-	-
Intron 14	1	-	-
Exon 15	1 synonyme	1 synonyme non associé	-
Intron 15	1	-	-
Exon 16	Non analysé	Non analysé	Non analysé

Le gène contenait 43 SNP entre ânes et cheval dont 11 entraînaient une mutation faux-sens, 12 SNP entre ânes dont 1 entraînaient une mutation faux-sens dans l'exon 9, et 5 insertions dans des introns.

Parmi les SNP entre les ânes et le cheval, les mutations A152Q, R153P, G193D, I232T, N258D, R352H, L348S, L534S étaient prédites comme étant bénignes par le logiciel Polyphen, tandis que les mutations suivantes étaient vraisemblablement dommageables : A148T (score de 0,708 sur 1), A290G (score de 0,954 sur 1) et P335L (score de 0,522 sur 1). Le SNP entre ânes, R352H, était prédit comme bénin.

L'étude de *MLPH* n'a donc pas permis de mettre en évidence de mutation associée à la couleur, cependant trois exons (10, 11 et 16) n'ont pas pu être analysés.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 58 à Annexe 70.

I.2.2.F *TYR*

Pour ce gène nous avons séquencé 6 ânes (2 Normands, 2 Berry, 2 Provence). Le séquençage de *TYR* a donné les résultats présentés dans le Tableau 29 :

Tableau 29: Variations de séquence identifiées dans le gène *TYR* chez les ânes.

Gène <i>TYR</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Exon 1	3 synonymes	-	-
Intron 1	4	-	-
Exon 2	3 synonymes	-	-
Intron 2	3	-	-
Exon 3	-	-	-
Intron 3	2	-	-
Exon 4	2 synonymes	-	-
Intron 4	-	-	-
Exon 5	1 synonyme	-	-
Intron 5	1	-	-

Ce gène ne contenait que des SNP entre cheval et ânes, tous synonymes lorsqu'ils intéressaient les exons. Ainsi aucune mutation associée à la couleur n'a été mise en évidence dans ce gène.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 71 à Annexe 75.

I.2.3 Gènes candidats pour les poils longs

I.2.3.A *FGF5*

Pour le séquençage des 3 exons de *FGF5*, nous avons d'abord utilisé quatre Baudets du Poitou et deux ânes Grand Noir du Berry. Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau 30) :

Tableau 30: Variations de séquence identifiées dans le gène *FGF5* chez les ânes. Del : délétion.

Gène <i>FGF5</i>	SNP cheval / âne	SNP entre ânes	Autres variations
Amont exon 1	1	-	-
Exon 1	-	1 non synonyme, non associé	-
Exon 2	-	-	Del 2pb
Exon 3	2	-	-

Le SNP entre ânes dans l'exon 1 n'était pas associé à la longueur du poil, en revanche nous avons pu constater l'existence d'une délétion de 2 pb dans l'exon 2 (Figure 69).

Figure 69: Alignement de la séquence partielle de l'exon 2 du gène *FGF5*, montrant une délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 du gène *FGF5* chez certains ânes. Horse : cheval. F : forward, R : reverse. Les nucléotides 100% conservés sont présentés en rouge, les nucléotides non conservés en bleu. Un tiret indique une absence de nucléotide.

	131	140	150	160	170	180	190	200
Exon2Horse	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Noune2R	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Uscope2R	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Noir2R	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Uda2R	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCG--	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Unour2R	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCG--	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Victoire2R	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCG--	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Noir2F	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Noune2F	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Uscope2F	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Uda2F	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCG--	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Victoire2F	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCG--	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Unour2F	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCG--	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTG				
Exon2strict	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGATGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGT				
Consensus	GGATTGTAGGAATACGAGGAGTTTTCAGCAACAATTTT	TAGCGatGTC	AAAAAAGG	AAACTCCATGCAAGTg				

Nous avons donc séquencé un cheval contrôle supplémentaire et analysé le génotype des ânes initialement séquencés (Tableau 31).

Tableau 31: Génotypes des six ânes et du cheval initialement séquencés, pour la délétion de 2pb située dans l'exon 2 du gène *FGF5*. Les ânes à poil long apparaissent en bleu clair. N : pas de délétion. Del : délétion.

Gène <i>FGF5</i>	Del (AT) exon 2
Berry 1 (poil court)	N/N
Berry 2 (poil court)	N/N
Baudet 1 (poil long)	del/del
Baudet 2 (poil long)	del/del
Baudet 3 (poil long)	del/del
Baudet 4 (poil mi-long)	N/del
Cheval noir	N/N
Cheval (Ensembl)	N

La délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 semblait donc être liée au phénotype poil long. Pour nous en assurer nous avons séquencé l'ensemble des chevaux et des ânes disponibles pour l'exon 2 de *FGF5*, les résultats sont présentés dans le Tableau 32.

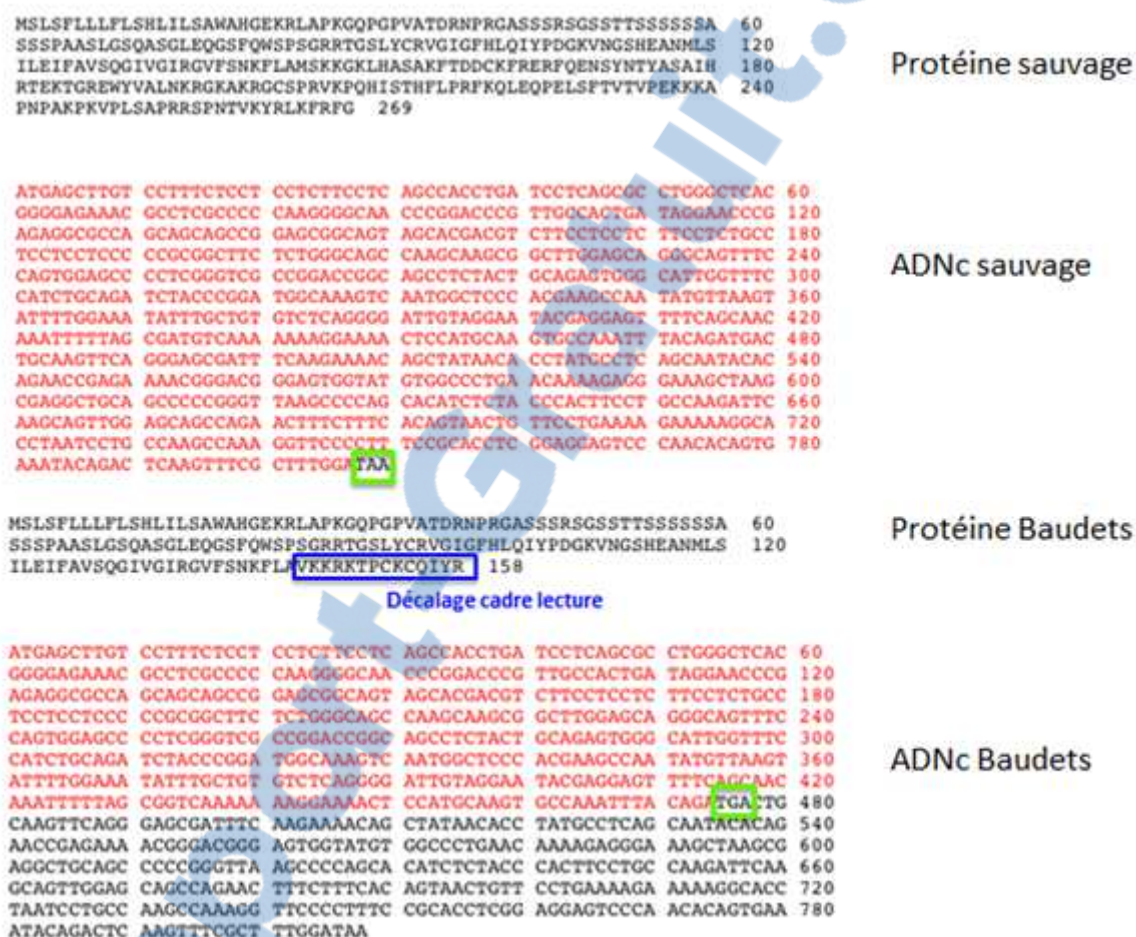
Tableau 32: Répartition des génotypes pour la délétion de 2pb située dans l'exon 2 du gène *FGF5* chez un panel d'ânes, de chevaux et de poneys de différentes races. N : pas de délétion. Del : délétion.

Génotypes pour la délétion (AT) de l'exon 2 de <i>FGF5</i>	N/N	N/del	del/del
Chevaux et poneys contrôles de 9 races	131	0	0
Ânes des Pyrénées	12	2	0
Ânes de Provence	16	0	0
Ânes Normands	17	1	0
Ânes Grands Noirs du Berry	8	0	0
Ânes du Cotentin	10	0	0
Ânes du Bourbonnais	1	1	0
Baudets du Poitou	0	4	31

Comme nous l'avons constaté, le phénotype poil long était bien associé au fait d'être homozygote pour la délétion. Seuls quatre animaux étaient hétérozygotes et possédaient un phénotype particulier. Parmi les chevaux, aucun des 131 animaux testés n'était homozygote ou hétérozygote pour la délétion et chez les races asines à poils courts, seuls quatre animaux sur soixante-huit étaient hétérozygotes. Certains de ces animaux possédaient un phénotype particulier avec des poils longs. Par exemple, chez les ânes des Pyrénées, les animaux hétérozygotes étaient une mère et son fils possédant des poils particulièrement fournis en toutes saisons.

La délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 se situait au niveau du codon 145, avec la délétion des bases AT d'un ATG codant une méthionine. Cette délétion décalait le cadre de lecture et il en résultait dans la protéine mutée l'apparition d'un codon stop prématuré 15 codons plus tard en position 158 : la protéine mutée était donc tronquée et ne faisait plus que 158 résidus au lieu de 269 (Figure 70).

Figure 70: Décalage du cadre de lecture et codon stop prématuré dans la transcription de *FGF5* chez les baudets du Poitou.



Cette délétion était donc très probablement très délétère et à l'origine du phénotype poil-long du Baudet du Poitou.

Les alignements et le tableau récapitulatif des SNP sont présentés en Annexe 76 à Annexe 78.

III. DISCUSSION

Le but de notre travail était de tenter d'identifier le support moléculaire des couleurs de robe et texture du pelage de cinq races asines françaises et de proposer une nomenclature des robes adaptée aux particularités asines.

Comme nous l'avons déjà dit, la nomenclature utilisée actuellement ne permet pas une description efficace de la robe des ânes. Officiellement, les haras classent les ânes en neuf couleurs : Souris, Bai, Bai brun, Bai Foncé, Noir, Noir Pangaré, Pie, Isabelle et Gris.

La consultation des fiches de pedigree, des photos et des arbres généalogiques disponibles sur le site des haras nationaux (<http://www.haras-nationaux.fr/utilitaires/moteurs-de-recherche/chevaux-et-poulains.html>) a rapidement montré que les couleurs de robe enregistrées auprès des haras n'étaient pas fiables et ne permettait donc pas de réaliser des arbres généalogiques de qualité, qui auraient permis d'étudier le mode de transmission des couleurs.

Si les Ânes de Provence ne présentent pas de souci particulier, étant définis comme Gris ou Gris tourterelle, il n'en va pas de même dans les autres races. Même lorsque leurs robes sont similaires, les ânes des Pyrénées sont décrits comme Bai foncé, Noir ou Noir Pangaré, les Grands Noirs du Berry sont décrits comme Noir ou Noir Pangaré et le Baudets du Poitou de Bai à Noir Pangaré.

C'est parmi la race Normande que nous avons rencontré la plus grande disparité avec des robes définies comme allant du Bai au Noir Pangaré. Sur la Figure 71, l'âne en haut à gauche est défini comme Noir Pangaré, celui en haut à droite comme Bai brun, et les deux du bas comme Bai.

Figure 71: Disparité des définitions pour les robes des ânes Normands (Sources : Photos INAM, Robes enregistrées aux Haras Nationaux)



L'objectif de ce travail était notamment de pouvoir préciser et mettre en ordre cette nomenclature, issue du cheval et qui comme on le voit ne correspond pas aux robes rencontrées ou n'est pas toujours justement utilisée. Par exemple un cheval décrit comme noir possède en effet une robe d'un noir profond, qu'on ne rencontre pas chez les ânes. Malgré un grand nombre de gènes séquencés nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de mutation liée à la couleur qui aurait pu permettre de différencier moléculairement le marron foncé du noir.

Cependant comme nous l'avons vu il est très probable que le gène *ASIP* soit impliqué dans la différenciation de la robe en noire, voir du Pangaré (décoloration du nez, du ventre et de l'intérieur des membres). Le résultat du séquençage de portions régulatrices très conservées n'a pas été concluant et la RT-PCR, bien que pertinente, n'a pas permis de trancher. Pour ce gène il aurait donc été très intéressant de pouvoir réaliser une RT-PCR quantitative sur un nombre suffisant d'animaux afin d'étudier les différences d'expression. Malheureusement il nous est parvenu un nombre insuffisant de biopsies de peau pour pouvoir réaliser un échantillon statistique de qualité. De plus si la RT-qPCR l'indiquait, un séquençage exhaustif des introns et des séquences régulatrices pourraient permettre d'identifier les mutations pangaré et noir. Ce travail serait cependant très long et coûteux, l'exon 1 non traduit et l'intron 1 contenant les séquences régulatrices du gène *ASIP* étant très longs.

En ce qui concerne le gène *MC1R*, aucun des ânes séquencés à ce locus ne pouvait être rapproché de la robe Alezan du cheval, ce qui peut expliquer que nous n'y ayons pas mis en évidence de variation. Cependant il est probable que les ânes décrits comme « rouges » possèdent un variant à ce locus, et le séquençage du gène *MC1R* de tels animaux serait intéressant. Notons cependant que la couleur « rouge » n'est pas reconnue dans les races que nous avons étudiées. Elle est présente, par exemple, chez les ânes miniatures américains.

Le fait que certains ânes possèdent une couleur marron qui ne s'approche ni du Bai ni de l'Alezan du cheval laissait à penser que le gène *TYRPI* permettrait de différencier des variants à ce locus. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une telle variabilité, cependant ces résultats préliminaires demandent à être complétés de la manière suivante :

- Exploration de l'association entre le SNP2 de l'exon1 (R70L) avec un grand nombre d'ânes (bien que peu probable).

- Exploration de l'association du SNP dans le 3'UTR avec un grand nombre d'ânes (semble associé au noir/marron).

- Réalisation d'une RT-qPCR pour identifier d'éventuelles variations d'expression.

Là encore, le manque de temps et un nombre insuffisants de biopsies ne nous ont pas permis de compléter nos recherches.

Pour le gène *PMEL17* nous avons observé des différences de répartition de certains SNP en fonction de la race. Une étude d'association sur un plus grand nombre d'animaux permettrait d'explorer un éventuel lien entre *PMEL17* et la couleur marron. La réalisation d'une RT-PCR quantitative sur *PMEL17* permettrait d'identifier d'éventuelles variations d'expression ou d'épissage, que l'on peut suspecter en raison de la délétion de 3 pb en amont de l'exon 11 (entraînant donc potentiellement une mutation dans le site d'épissage).

Concernant les Baudets du Poitou, les analyses génétiques nous ont permis de mettre en évidence une délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 de *FGF5* présente à l'état homozygote chez tous les animaux à poils longs et absente à l'état homozygote chez tous les animaux à poils courts. Le nombre élevé d'animaux analysés (36 Baudets, 131 chevaux et 68 ânes d'autres races) nous permettent raisonnablement de penser que cette mutation est responsable du phénotype poil long. En décalant le cadre de lecture, cette délétion provoque l'apparition d'un codon stop prématuré. La protéine mutée ne fait plus que 158 résidus au lieu des 269 de la protéine sauvage. Ceci ne doit plus lui permettre de jouer le rôle régulateur que nous avons vu, entraînant une pousse continue du poil.

Même si à ce stade nous n'avons pas pu classer avec certitude les différentes couleurs rencontrées à partir de leur déterminisme moléculaire qui reste à élucider, nous pouvons proposer un début de terminologie à adapter en fonction des résultats futurs.

La robe doit être déterminée en fonction de la couleur majoritaire du corps, sur des animaux adultes portant leur robe d'été, sans tenir compte initialement de la couleur du pourtour des yeux ou du museau.

Pour les ânes Grand Noir du Berry et des Pyrénées : robe Noire (croix non visible, ou très discrètement, dans certaines conditions d'éclairage). L'appellation Noir Pangaré est incorrecte, elle est actuellement utilisée pour décrire les reflets cuivrés de la robe qui apparaissent, en particulier après l'été. Le terme Pangaré est à réserver à la décoloration crème à blanche autour des yeux, du bout du nez, du ventre et des ars. Elle est présente chez tous les ânes des cinq races étudiées. Tous sont donc Pangaré, qu'ils soient Noir, Brun ou Gris.

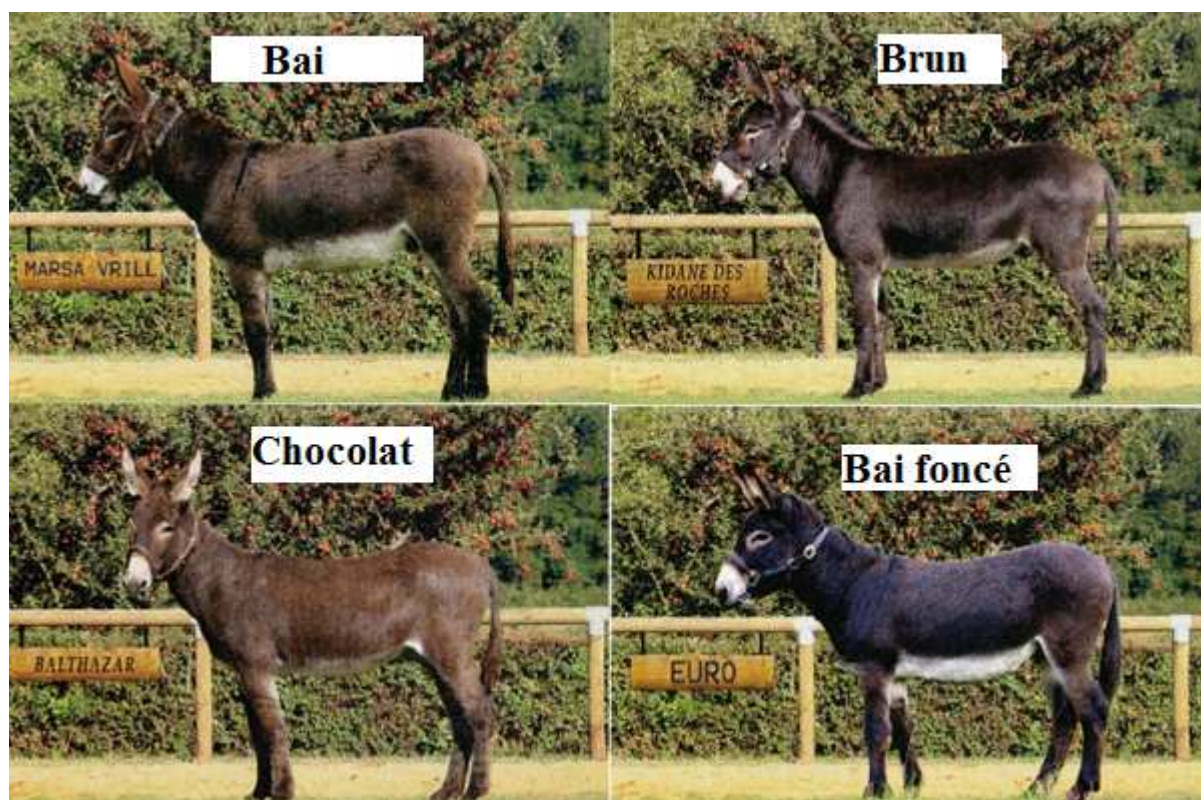
Pour les ânes présentant des reflets roux, le terme Noir Cuivré pourrait être utilisé, en remplacement de Noir Pangaré qui est incorrect.

Pour les ânes de Provence : robe Grise.

Pour les ânes Normands : en l'absence de mise en évidence d'une mutation « marron », nous proposons de continuer d'utiliser la terminologie de Bai lorsqu'elle s'y prête. Nous proposons également de bannir la terminologie Noir ou Noir Pangaré pour cette race. La terminologie pourrait être la suivante :

- Si l'animal présente une robe de couleur marron, avec des membres et une queue noire : Bai (avec éventuellement la mention Bai clair et Bai foncé).
 - Si l'animal présente une robe de couleur marron avec des membres de la même couleur ou plus foncés sans être noirs : Chocolat pour un marron clair, Brun pour marron foncé.
- Cela donnerait (Figure 72) ainsi pour les mêmes ânes que précédemment :

Figure 72: Terminologie proposée pour les ânes Normands



Pour les Baudets du Poitou : il nous a semblé que tous les individus possédaient une robe de base Noire (sans croix visible), qui s'éclaircit avec la pousse du poil (décoloration due au soleil, en particulier). Pour ces ânes le problème réside dans le fait que la robe n'est pas toujours uniforme, en fonction de la longueur de poil, ce qui rend sa description difficile. Dans tous les cas nous proposons de bannir l'emploi du terme Bai qui semble ici peu adapté. A la place, nous proposons d'utiliser les termes « robe de base Noire » avec poil long Brun ou « robe de base Noire » avec poil long Fougère pour les robes plus rousses et plus claires tirant sur le roux-jaune, en se référant préférentiellement aux zones de poils longs qui sont la caractéristique de cette race, ou à défaut la couleur majoritaire (Figure 73).

Figure 73: Terminologie proposée pour les Baudets du Poitou



CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif de rechercher des mutations potentiellement responsables des différentes couleurs de robes observées chez cinq races d'ânes, qui auraient pu permettre de définir clairement les robes Noir, Bai et les différentes teintes de marron. Cela aurait ainsi pu permettre de proposer une terminologie solide et plus précise basée sur des différences moléculaires concrètes.

Nous souhaitons aussi mettre en évidence la mutation responsable du poil long observé chez les Baudets du Poitou.

Après un travail bibliographique pour identifier et choisir les gènes d'intérêt, nous avons pu procéder à leur séquençage, majoritairement limité aux parties codantes.

Pour ce faire, nous avons disposé de nombreux prélèvements de sang, de poils ou de brochettes buccales fournies par les propriétaires et les éleveurs, sous l'égide de l'INAM. Ceux-ci nous ont permis, après extraction de l'ADN, de comparer les séquences génétiques obtenues parmi les différentes races, avec des chevaux témoins, ainsi que à la base de données Ensembl.

Malgré un nombre élevé d'exons séquencés pour des gènes candidats, nous n'avons pas pu mettre en évidence de mutation associée aux différentes couleurs observées. Cependant des RT-qPCR pourraient permettre de mettre en évidence des différences d'expression dans *ASIP* et *TYRP1* qui sont suspectés de jouer un rôle dans la robe noire et marron. Un séquençage exhaustif des séquences régulatrices, voire des introns pourrait alors lever le voile sur les différences au niveau moléculaire.

En revanche, les analyses génétiques nous ont permis de mettre en évidence une délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 de *FGF5*, présente chez les animaux à poils longs et absente chez tous les animaux à poils courts. Le nombre élevé d'animaux analysés nous permet de penser que cette mutation est responsable du phénotype poil long chez le Baudet du Poitou. En décalant le cadre de lecture, cette délétion provoque l'apparition d'un codon stop prématuré, qui raccourcit la protéine et entraîne très probablement son défaut d'activité.

Rapport-Gratuit.com

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Malek, Z., Suzuki, I., Tada, A., Im, S., Akcali, C., 1999. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 885, 117–133.
- Abdel-Malek, Z.A., Knittel, J., Kadekaro, A.L., Swope, V.B., Starner, R., 2008. The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes--a shift in paradigm. *Photochem. Photobiol.* 84, 501–508.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
- Aigner, B., Besenfelder, U., Müller, M., Brem, G., 2000. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mamm. Genome* 11, 700–702.
- Barral, D.C., Seabra, M.C., 2004. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res.* 17, 111–118.
- Barsh, G.S., 1996. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet.* 12, 299–305.
- Beja-Pereira, A., England, P.R., Ferrand, N., Jordan, S., Bakhiet, A.O., Abdalla, M.A., Mashkour, M., Jordana, J., Taberlet, P., Luikart, G., 2004. African origins of the domestic donkey. *Science* 304, 1781.
- Bellone, R.R., Brooks, S.A., Sandmeyer, L., Murphy, B.A., Forsyth, G., Archer, S., Bailey, E., Grahn, B., 2008. Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics* 179, 1861–1870.
- Bellone, R.R., Forsyth, G., Leeb, T., Archer, S., Sigurdsson, S., Inslund, F., Mauceli, E., Engensteiner, M., Bailey, E., Sandmeyer, L., Grahn, B., Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., 2010. Fine-mapping and mutation analysis of TRPM1: a candidate gene for leopard complex (LP) spotting and congenital stationary night blindness in horses. *Brief Funct Genomics* 9, 193–207.
- Bennett, D.C., Lamoreux, M.L., 2003. The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res.* 16, 333–344.
- Bensignor, E., Groux, D., Lebis, C., 2004. *Les maladies de peau chez le cheval*. Maloine, Paris.
- Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., Marks, M.S., 2001. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* 12, 3451–3464.
- Bricker et al., 2003. Linkage of the Dun coat color locus to microsatellites on horse chromosome 8 [WWW Document]. URL http://www.intl-pag.org/11/abstracts/P5n_P640_XI.html (accessed 7.30.13).
- Brooks, S.A., Bailey, E., 2005. Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mamm. Genome* 16, 893–902.
- Brooks, S.A., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., 2007. A chromosome inversion near the KIT gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenet. Genome Res.* 119, 225–230.
- Brunberg, E., Andersson, L., Cothran, G., Sandberg, K., Mikko, S., Lindgren, G., 2006. A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet.* 7, 46.

- Bultman, S.J., Klebig, M.L., Michaud, E.J., Sweet, H.O., Davisson, M.T., Woychik, R.P., 1994. Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. *Genes Dev.* 8, 481–490.
- Bultman, S.J., Michaud, E.J., Woychik, R.P., 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71, 1195–1204.
- Cadiou, E., Neff, M.W., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H.G., VonHoldt, B.M., Rhue, A., Boyko, A., Byers, A., Wong, A., Mosher, D.S., Elkahoul, A.G., Spady, T.C., Andre, C., Lark, K.G., Cargill, M., Bustamante, C.D., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science* 326, 150–153.
- Candille, S.I., Kaelin, C.B., Cattanch, B.M., Yu, B., Thompson, D.A., Nix, M.A., Kerns, J.A., Schmutz, S.M., Millhauser, G.L., Barsh, G.S., 2007. A β -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science* 318, 1418–1423.
- Chintala, S., Li, W., Lamoreux, M.L., Ito, S., Wakamatsu, K., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Park, Y.-M., Gahl, W.A., Huizing, M., Spritz, R.A., Ben, S., Novak, E.K., Tan, J., Swank, R.T., 2005. Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10964–10969.
- Ciciotte, S.L., Gwynn, B., Moriyama, K., Huizing, M., Gahl, W.A., Bonifacino, J.S., Peters, L.L., 2003. Cappuccino, a mouse model of Hermansky-Pudlak syndrome, encodes a novel protein that is part of the pallidin-muted complex (BLOC-1). *Blood* 101, 4402–4407.
- Clark, L.A., Wahl, J.M., Rees, C.A., Strain, G.M., Cargill, E.J., Vanderlip, S.L., Murphy, K.E., 2008. Canine SINEs and Their Effects on Phenotypes of the Domestic Dog, in: Gustafson, J.P., Taylor, J., Stacey, G. (Eds.), *Genomics of Disease*, Stadler Genetics Symposia Series. Springer New York, pp. 79–88.
- Cook, D., Brooks, S., Bellone, R., Bailey, E., 2008. Missense mutation in exon 2 of SLC36A1 responsible for champagne dilution in horses. *PLoS Genet.* 4, e1000195.
- Delevoe, C., Giordano, F., van Niel, G., Raposo, G., 2011. La biogenèse des mélanosomes: L'échiquier de la pigmentation. *médecine/sciences* 27, 153–162.
- Delevoe, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J.-B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W.J.C., Verkleij, A.J., Salamero, J., Marks, M.S., Raposo, G., 2009. AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* 187, 247–264.
- Di Pietro, S.M., Falcón-Pérez, J.M., Tenza, D., Setty, S.R.G., Marks, M.S., Raposo, G., Dell'Angelica, E.C., 2006. BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Mol. Biol. Cell* 17, 4027–4038.
- Dooley, C.M., Schwarz, H., Mueller, K.P., Mongera, A., Konantz, M., Neuhauss, S.C.F., Nüsslein-Volhard, C., Geisler, R., 2013. Slc45a2 and V-ATPase are regulators of melanosomal pH homeostasis in zebrafish, providing a mechanism for human pigment evolution and disease. *Pigment Cell Melanoma Res* 26, 205–217.
- Drögemüller, C., Philipp, U., Haase, B., Günzel-Apel, A.R., Leeb, T., 2007. A noncoding melanophilin gene (MLPH) SNP at the splice donor of exon 1 represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs. *Journal of Heredity* 98, 468–473.
- Du, J., Fisher, D.E., 2002. Identification of Aim-1 as the underwhite Mouse Mutant and Its Transcriptional Regulation by MITF. *J. Biol. Chem.* 277, 402–406.
- Dubchak, I., Brudno, M., Loots, G.G., Pachter, L., Mayor, C., Rubin, E.M., Frazer, K.A., 2000. Active conservation of noncoding sequences revealed by three-way species comparisons. *Genome Res.* 10, 1304–1306.

- Ebanks, J.P., Wickett, R.R., Boissy, R.E., 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci* 10, 4066–4087.
- Fontanesi, L., Forestier, L., Allain, D., Scotti, E., Beretti, F., Deretz-Picoulet, S., Pecchioli, E., Vernesi, C., Robinson, T.J., Malaney, J.L., Russo, V., Oulmouden, A., 2010. Characterization of the rabbit agouti signaling protein (ASIP) gene: Transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. *Genomics* 95, 166–175.
- Fontanesi, L., Rustempašić, A., Brka, M., Russo, V., 2012. Analysis of polymorphisms in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes and association with coat colours in two Pramenka sheep types. *Small Ruminant Research* 105, 89–96.
- Fuchs, E., Merrill, B.J., Jamora, C., DasGupta, R., 2001. At the roots of a never-ending cycle. *Dev. Cell* 1, 13–25.
- Gandolfi, B., Alhaddad, H., Joslin, S.E.K., Khan, R., Filler, S., Brem, G., Lyons, L.A., 2013. A splice variant in KRT71 is associated with curly coat phenotype of Selkirk Rex cats. *Sci. Rep.* 3.
- Gautam, R., Novak, E.K., Tan, J., Wakamatsu, K., Ito, S., Swank, R.T., 2006. Interaction of Hermansky-Pudlak Syndrome genes in the regulation of lysosome-related organelles. *Traffic* 7, 779–792.
- Geras, A.J., Greaves, M.W., 1990. *Dermatology a Medical Artist's Interpretation*, 1ST edition. ed. Sandoz Medical Publications.
- Ginger, R.S., Askew, S.E., Ogborne, R.M., Wilson, S., Ferdinando, D., Dadd, T., Smith, A.M., Kazi, S., Szerencsei, R.T., Winkfein, R.J., Schnetkamp, P.P.M., Green, M.R., 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.
- Guyonneau, L., Murisier, F., Rossier, A., Moulin, A., Beermann, F., 2004. Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3396–3403.
- Haase, B., Brooks, S.A., Schlumbaum, A., Azor, P.J., Bailey, E., Alaeddine, F., Mevissen, M., Burger, D., Poncet, P.-A., Rieder, S., Leeb, T., 2007. Allelic heterogeneity at the equine KIT locus in dominant white (W) horses. *PLoS Genet.* 3, e195.
- Harper, D.C., Theos, A.C., Herman, K.E., Tenza, D., Raposo, G., Marks, M.S., 2008. Premelanosome amyloid-like fibrils are composed of only golgi-processed forms of Pmel17 that have been proteolytically processed in endosomes. *J. Biol. Chem.* 283, 2307–2322.
- Hearing, V.J., 2005. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* 37, 3–14.
- Heath, J.W., 2008. *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*, 2e Edition. ed. De Boeck, Bruxelles.
- Hébert, J.M., Rosenquist, T., Götz, J., Martin, G.R., 1994. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: Evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78, 1017–1025.
- Hoekstra, H.E., 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97, 222–234.
- Housley, D.J.E., Venta, P.J., 2006. The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine “hair”-itability. *Animal Genetics* 37, 309–315.
- Hume, A.N., Ushakov, D.S., Tarafder, A.K., Ferenczi, M.A., Seabra, M.C., 2007. Rab27a and MyoVa are the primary Mlph interactors regulating melanosome transport in melanocytes. *J. Cell. Sci.* 120, 3111–3122.

- Ishida, Y., David, V.A., Eizirik, E., Schäffer, A.A., Neelam, B.A., Roelke, M.E., Hannah, S.S., O'Brien, S.J., Menotti-Raymond, M., 2006. A homozygous single-base deletion in *MLPH* causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat. *Genomics* 88, 698–705.
- Jackson, I.J., 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu. Rev. Genet.* 28, 189–217.
- Jackson, I.J., Budd, P., Horn, J.M., Johnson, R., Raymond, S., Steel, K., 1994. Genetics and molecular biology of mouse pigmentation. *Pigment Cell Res.* 7, 73–80.
- Jordan, S.A., Jackson, I.J., 2000. *MGF* (*KIT* ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev. Biol.* 225, 424–436.
- Kadekaro, A.L., Kanto, H., Kavanagh, R., Abdel-Malek, Z.A., 2003. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994, 359–365.
- Kehler, J.S., David, V.A., Schäffer, A.A., Bajema, K., Eizirik, E., Ryugo, D.K., Hannah, S.S., O'Brien, S.J., Menotti-Raymond, M., 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.
- Kerns, J.A., Newton, J., Berryere, T.G., Rubin, E.M., Cheng, J.F., Schmutz, S.M., Barsh, G.S., 2004. Characterization of the dog *Agouti* gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome* 15, 798–808.
- Kimura, B., Marshall, F.B., Chen, S., Rosenbom, S., Moehlman, P.D., Tuross, N., Sabin, R.C., Peters, J., Barich, B., Yohannes, H., Kebede, F., Teclai, R., Beja-Pereira, A., Mulligan, C.J., 2011. Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proc. Biol. Sci.* 278, 50–57.
- Knottenbelt, D.C., McGarry, J.W., Pascoe, R.R., 2009. *Pascoe's principles & practice of equine dermatology*, 2nd Edition. ed. Elsevier/Saunders, Edinburgh; New York.
- Kuroda, T.S., Ariga, H., Fukuda, M., 2003. The Actin-Binding Domain of *Slac2-a*/Melanophilin Is Required for Melanosome Distribution in Melanocytes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5245–5255.
- Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W.D., Ferrans, V.J., Muller, J., Appella, E., Hearing, V.J., 2001. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10698–10703.
- Kwon, B.S., Halaban, R., Ponnazhagan, S., Kim, K., Chintamaneni, C., Bennett, D., Pickard, R.T., 1995. Mouse silver. mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of *Pmel 17*. *Nucl. Acids Res.* 23, 154–158.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.-A.P.K., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Jurynec, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., Sinha, S., Moore, J.L., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, P.M., O'donnell, D., Kittles, R., Parra, E.J., Mangini, N.J., Grunwald, D.J., Shriver, M.D., Canfield, V.A., Cheng, K.C., 2005. *SLC24A5*, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310, 1782–1786.
- Lehman, A.L., Silvers, W.K., Puri, N., Wakamatsu, K., Ito, S., Brilliant, M.H., 2000. The Underwhite (*uw*) Locus Acts Autonomously and Reduces the Production of Melanin. *Journal of Investigative Dermatology* 115, 601–606.
- Lennartsson, J., Rönnstrand, L., 2012. Stem cell factor receptor/*c-Kit*: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* 92, 1619–1649.
- Loftus, S.K., Larson, D.M., Baxter, L.L., Antonellis, A., Chen, Y., Wu, X., Jiang, Y., Bittner, M., Hammer, J.A., 3rd, Pavan, W.J., 2002. Mutation of melanosome protein *RAB38* in chocolate mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4471–4476.

- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., Wilkison, W.O., 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371, 799–802.
- Lyons, Leslie A, Foe, I.T., Rah, H.C., Grahn, R.A., 2005. Chocolate coated cats: TYRP1 mutations for brown color in domestic cats. *Mamm. Genome* 16, 356–366.
- Lyons, L A, Imes, D.L., Rah, H.C., Grahn, R.A., 2005. Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*). *Anim. Genet.* 36, 119–126.
- Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., Jackson, I.J., 1997. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 192, 99–107.
- Mariat, D., Taourit, S., Guérin, G., 2003. A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection Evolution* 35, 119.
- Marklund, S., Moller, M., Sandberg, K., Andersson, L., 1999. Close association between sequence polymorphism in the KIT gene and the roan coat color in horses. *Mammalian genome* 10, 283–288.
- Matesic, L.E., Yip, R., Reuss, A.E., Swing, D.A., O’Sullivan, T.N., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 2001. Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *PNAS* 98, 10238–10243.
- Matsunaga, N., Virador, V., Santis, C., Vieira, W.D., Furumura, M., Matsunaga, J., Kobayashi, N., Hearing, V.J., 2000. In situ localization of agouti signal protein in murine skin using immunohistochemistry with an ASP-specific antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 176–182.
- Miller, W.H., Griffin, C.E., Campbell, K.L., 2012. *Muller and Kirk’s Small Animal Dermatology*. Elsevier Health Sciences.
- Moore, K.J., Swing, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1990. Interaction of the murine dilute suppressor gene (*dsu*) with fourteen coat color mutations. *Genetics* 125, 421–430.
- Moore, K.J., Swing, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1994. The murine dilute suppressor gene encodes a cell autonomous suppressor. *Genetics* 138, 491–497.
- Newton, J.M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Gardner, J.M., Davisson, M.T., King, R.A., Brilliant, M.H., 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, E.K., Kermani, M., Fluhr, J., Peters, L.L., Swank, R.T., Wei, M.L., 2002. Melanosome morphologies in murine models of hermannsky-pudlak syndrome reflect blocks in organelle development. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1156–1164.
- Nizamani, A.W., 2008. Pigmentation de la peau chez le bovin: étude du polymorphisme et de l’expression du gène PAR-2 (thesis). Université de Limoges.
- O’Sullivan, T.N., Wu, X.S., Rachel, R.A., Huang, J.-D., Swing, D.A., Matesic, L.E., Hammer, J.A., 3rd, Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 2004. *dsu* functions in a MYO5A-independent pathway to suppress the coat color of dilute mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16831–16836.
- Ohbayashi, N., Fukuda, M., 2012. Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics. *Journal of Biochemistry* 151, 343–351.
- Ohbayashi, N., Maruta, Y., Ishida, M., Fukuda, M., 2012. Melanoregulin regulates retrograde melanosome transport through interaction with the RILP-p150Glued complex in melanocytes. *J. Cell. Sci.* 125, 1508–1518.

- Philipp, U., Hamann, H., Mecklenburg, L., Nishino, S., Mignot, E., Günzel-Apel, A.R., Schmutz, S.M., Leeb, T., 2005. Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs. *BMC genetics* 6, 34.
- Pielberg, G.R., Golovko, A., Sundström, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M.H., Druml, T., Binns, M., Fitzsimmons, C., Lindgren, G., 2008. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature genetics* 40, 1004–1009.
- Provance, D.W., James, T.L., Mercer, J.A., 2002. Melanophilin, the Product of the Leaden Locus, is Required for Targeting of Myosin-Va to Melanosomes. *Traffic* 3, 124–132.
- Raposo, G., Marks, M.S., 2007. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 786–797.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., Marks, M.S., 2001. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell Biol.* 152, 809–824.
- Rieder, S., Taourit, S., Mariat, D., Langlois, B., Guérin, G., 2001. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian genome* 12, 450–455.
- Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G., Cone, R.D., 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827–834.
- Rosenquist, T.A., Martin, G.R., 1996. Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: Expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle. *Developmental Dynamics* 205, 379–386.
- Runkel, F., Büssow, H., Seburn, K.L., Cox, G.A., Ward, D.M., Kaplan, J., Franz, T., 2006a. Grey, a novel mutation in the murine Lyst gene, causes the beige phenotype by skipping of exon 25. *Mamm Genome* 17, 203–210.
- Runkel, F., Klasten, M., Koch, K., Böhnert, V., Büssow, H., Fuchs, H., Franz, T., Angelis, M.H. de, 2006b. Morphologic and molecular characterization of two novel Krt71 (Krt2-6g) mutations: Krt71 rco12 and Krt71 rco13. *Mamm Genome* 17, 1172–1182.
- Santschi, E.M., Vrotsos, P.D., Purdy, A.K., Mickelson, J.R., 2001. Incidence of the endothelin receptor B mutation that causes lethal white foal syndrome in white-patterned horses. *Am. J. Vet. Res.* 62, 97–103.
- Schmidt-Küntzel, A., Eizirik, E., O'Brien, S.J., 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.
- Schmutz, S.M., Berryere, T.G., Ciobanu, D.C., Mileham, A.J., Schmitz, B.H., Fredholm, M., 2004. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm. Genome* 15, 62–67.
- Schmutz, S.M., Berryere, T.G., Goldfinch, A.D., 2002. TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mamm Genome* 13, 380–387.
- Schmutz, S.M., Dreger, D.L., 2013. Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle. *Animal Genetics* 44, 9–13.
- Schnetkamp, P.P.M., 2013. The SLC24 gene family of Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers: From sight and smell to memory consolidation and skin pigmentation. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 455–464.
- Scott, D.W., 2004. Skin of the neck, mane and tail of the curly horse. *Equine Veterinary Education* 16, 201–206.
- Scott, D.W., Miller, W.H., 2011. *Equine dermatology*, 2nd Edition. ed. Elsevier/Saunders, Maryland Heights, Mo.

- Scott, M.C., Wakamatsu, K., Ito, S., Kadekaro, A.L., Kobayashi, N., Groden, J., Kavanagh, R., Takakuwa, T., Virador, V., Hearing, V.J., Abdel-Malek, Z.A., 2002. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J. Cell. Sci.* 115, 2349–2355.
- Seiberg, M., 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* 14, 236–242.
- Seitz, J.J., Schmutz, S.M., Thue, T.D., Buchanan, F.C., 1999. A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle. *Mammalian Genome* 10, 710–712.
- Setty, S.R.G., Tenza, D., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Raposo, G., Marks, M.S., 2008. Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature* 454, 1142–1146.
- Setty, S.R.G., Tenza, D., Truschel, S.T., Chou, E., Sviderskaya, E.V., Theos, A.C., Lamoreux, M.L., Di Pietro, S.M., Starcevic, M., Bennett, D.C., Dell'Angelica, E.C., Raposo, G., Marks, M.S., 2007. BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol. Biol. Cell* 18, 768–780.
- Siracusa, L.D., 1994. The agouti gene: turned on to yellow. *Trends Genet.* 10, 423–428.
- Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 2006. Mouse coat color mutations: From fancy mice to functional genomics. *Developmental Dynamics* 235, 2401–2411.
- Stenn, K.S., Paus, R., 2001. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev* 81, 449–494.
- Sundberg, J.P., Rourk, M.H., Boggess, D., Hogan, M.E., Sundberg, B.A., Bertolino, A.P., 1997. Angora Mouse Mutation: Altered Hair Cycle, Follicular Dystrophy, Phenotypic Maintenance of Skin Grafts, and Changes in Keratin Expression. *Vet Pathol* 34, 171–179.
- Suzuki, I., Tada, A., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., Im, S., Lamoreux, M.L., Hearing, V.J., Nordlund, J.J., Abdel-Malek, Z.A., 1997. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J. Invest. Dermatol.* 108, 838–842.
- Suzuki, S., Ota, Y., Ozawa, K., Imamura, T., 2000. Dual-Mode Regulation of Hair Growth Cycle by Two Fgf-5 Gene Products. *J. Invest. Dermatol.* 114, 456–463.
- Suzuki, T., Oiso, N., Gautam, R., Novak, E.K., Panthier, J.-J., Suprabha, P.G., Vida, T., Swank, R.T., Spritz, R.A., 2003. The mouse organellar biogenesis mutant buff results from a mutation in Vps33a, a homologue of yeast vps33 and *Drosophila* carnation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1146–1150.
- Sweet, H.O., Brilliant, M.H., Cook, S.A., Johnson, K.R., Davisson, M.T., 1998. Brief communication. A new allelic series for the underwhite gene on mouse chromosome 15. *J. Hered* 89, 546–551.
- Theos, Alexander C., Tenza, D., Martina, J.A., Hurbain, I., Peden, A.A., Sviderskaya, E.V., Stewart, A., Robinson, M.S., Bennett, D.C., Cutler, D.F., Bonifacino, J.S., Marks, M.S., Raposo, G., 2005. Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol. Biol. Cell* 16, 5356–5372.
- Theos, Alexander C., Truschel, S.T., Raposo, G., Marks, M.S., 2005. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res* 18, 322–336.
- Våge, D.I., Klungland, H., Lu, D., Cone, R.D., 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome* 10, 39–43.
- Våge, D.I., Lu, D., Klungland, H., Lien, S., Adalsteinsson, S., Cone, R.D., 1997. A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat. Genet.* 15, 311–315.

- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., Thody, A.J., 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11, 328–330.
- Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.-M., Lambert, J., 2006. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7, 769–778.
- Videira, I.F. dos S., Moura, D.F.L., Magina, S., 2013. Mechanisms regulating melanogenesis*. *An Bras Dermatol* 88, 76–83.
- Wasmeier, C., Hume, A.N., Bolasco, G., Seabra, M.C., 2008. Melanosomes at a glance. *J Cell Sci* 121, 3995–3999.
- Wei, M.L., 2006. Hermansky–Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Research* 19, 19–42.
- Wilkie, A.L., Jordan, S.A., Jackson, I.J., 2002. Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development* 129, 3349–3357.
- Wilson, S.M., Yip, R., Swing, D.A., O’Sullivan, T.N., Zhang, Y., Novak, E.K., Swank, R.T., Russell, L.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 2000. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7933–7938.
- Wu, X.S., Masedunskas, A., Weigert, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hammer, J.A., 2012. Melanoregulin regulates a shedding mechanism that drives melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2101–2109.
- Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hammer, J.A., 3rd, 2002. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* 4, 271–278.
- Xu, X., Dong, G.-X., Hu, X.-S., Miao, L., Zhang, X.-L., Zhang, D.-L., Yang, H.-D., Zhang, T.-Y., Zou, Z.-T., Zhang, T.-T., Zhuang, Y., Bhak, J., Cho, Y.S., Dai, W.-T., Jiang, T.-J., Xie, C., Li, R., Luo, S.-J., 2013. The Genetic Basis of White Tigers. *Current Biology* 23, 1031–1035.
- Yamamoto, O., Bhawan, J., 1994. Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res.* 7, 158–169.
- Yang, G.C., Croaker, D., Zhang, A.L., Manglick, P., Cartmill, T., Cass, D., 1998. A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS); a horse variant of Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1047–1052.
- Yasumoto, K., Watabe, H., Valencia, J.C., Kushimoto, T., Kobayashi, T., Appella, E., Hearing, V.J., 2004a. 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., Watabe, H., Valencia, J.C., Kushimoto, T., Kobayashi, T., Appella, E., Hearing, V.J., 2004b. 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.
- Yokoyama, T., Silversides, D.W., Waymire, K.G., Kwon, B.S., Takeuchi, T., Overbeek, P.A., 1990. Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res.* 18, 7293–7298.
- Yoshida, H., Kunisada, T., Kusakabe, M., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I., 1996. Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development* 122, 1207–1214.
- Zdarsky, E., Favor, J., Jackson, I.J., 1990. The molecular basis of brown, an old mouse mutation, and of an induced revertant to wild type. *Genetics* 126, 443–449.

ANNEXES

Annexe 1: Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> exon 1	119
Annexe 2: Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> exon 2	120
Annexe 3: Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> exon 3	121
Annexe 4: Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> Promoteur partie 2	122
Annexe 5 : Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> Promoteur partie 3	123
Annexe 6: Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> Promoteur partie 4	125
Annexe 7: Alignement de séquences pour <i>ASIP</i> Promoteur partie 5	126
Annexe 8: Alignement de séquences pour <i>MC1R</i> partie 1	127
Annexe 9: Alignement de séquences pour <i>MC1R</i> partie 2	129
Annexe 10: Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 1	130
Annexe 11: Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 2	131
Annexe 12: Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 3	132
Annexe 13: Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 4	133
Annexe 14: Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 5	134
Annexe 15: Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 6	135
Annexe 16 : Alignement de séquences pour <i>TYRPI</i> exon 7	136
Annexe 17 : Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exon 1	137
Annexe 18: Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exon 2	138
Annexe 19: Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exons 3 et 4	139
Annexe 20: Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exon 5	140
Annexe 21: Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exon 6	141
Annexe 22: Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exon 7	142
Annexe 23: Alignement de séquences pour <i>DCT</i> exon 8	142
Annexe 24: Alignement de séquences pour <i>BD103</i> exon 1	143
Annexe 25: Alignement de séquences pour <i>BD103</i> exon 2	144
Annexe 26: Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exon 1	145
Annexe 27: Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exons 2 et 3	146
Annexe 28: Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exons 4 et 5	147
Annexe 29 : Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exon 6	148
Annexe 30: Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exons 7 et 8	149
Annexe 31: Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exon 9 et 10	150
Annexe 32 : Alignement de séquences pour <i>PMEL</i> exon 11	151
Annexe 33: Alignement de séquences pour <i>RAB27a</i> exon 2	152
Annexe 34: Alignement de séquences pour <i>RAB27a</i> exon 3	153
Annexe 35: Alignement de séquences pour <i>RAB27a</i> exon 4	154
Annexe 36: Alignement de séquences pour <i>RAB27a</i> exon 5	155
Annexe 37: Alignement de séquences pour <i>RAB27a</i> exon 6	156
Annexe 38: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 1	157
Annexe 39: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 2	158
Annexe 40: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 3	158
Annexe 41: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 4	159
Annexe 42: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 5	159
Annexe 43: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 6	160
Annexe 44: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 7	160
Annexe 45: Alignement de séquences pour <i>KITL</i> exon 8	161
Annexe 46: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 1	162



Annexe 47: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 2.....	163
Annexe 48: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 3.....	164
Annexe 49: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 4.....	165
Annexe 50: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 6.....	166
Annexe 51: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 7.....	167
Annexe 52: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 8.....	168
Annexe 53: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 9.....	168
Annexe 54: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 10.....	169
Annexe 55: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 11.....	170
Annexe 56: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 12.....	171
Annexe 57: Alignement de séquences pour <i>VPS33a</i> exon 13.....	172
Annexe 58: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 1	173
Annexe 59: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 2	174
Annexe 60: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 3	175
Annexe 61: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 4	176
Annexe 62: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 5	177
Annexe 63: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 6	178
Annexe 64: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 7	179
Annexe 65: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 8	180
Annexe 66: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 9	181
Annexe 67: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 12	182
Annexe 68: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 13	183
Annexe 69: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 14	183
Annexe 70: Alignement de séquences pour <i>MLPH</i> exon 15	184
Annexe 71: Alignement de séquences pour <i>TYR</i> exon 1	185
Annexe 72: Alignement de séquences pour <i>TYR</i> exon 2	186
Annexe 73: Alignement de séquences pour <i>TYR</i> exon 3	187
Annexe 74: Alignement de séquences pour <i>TYR</i> exon 4	187
Annexe 75: Alignement de séquences pour <i>TYR</i> exon 5	188
Annexe 76: Alignement de séquences pour <i>FGF5</i> exon 1.....	189
Annexe 77: Alignement de séquences pour <i>FGF5</i> exon 2.....	190
Annexe 78: Alignement de séquences pour <i>FGF5</i> exon 3.....	191

Dans les alignements de séquences obtenus avec Multalin nous avons utilisé les conventions suivantes : la première ligne est toujours la séquence du gène chez le cheval telle que disponible dans la base de donnée Ensembl, elle est composée du nom du gène, de l'exon et de « horse », exemple : ASIPex1Horse pour l'exon 1 du gène *Agouti Signaling Protein* chez le cheval. Le terme « strict » est utilisé pour désigner la phase codante de l'exon analysé. En effet, nous avons inclus dans notre séquençage les jonctions introns-exons. Les autres séquences ont été nommées selon les abréviations du nom des ânes suivies du numéro de l'exon et du sens de lecture, F pour « Forward » et R pour « Reverse ». Quelques abréviations sont résumées dans le tableau suivant :

Abréviations utilisées pour les alignements de séquences

Abréviation	Animal Correspondant	Race
Bal1F	Balthazar	Âne Normand
Euro1F	Euro	Âne Normand
Alt1F	Altesse	Âne des Pyrénées
AN1F	Aigle Noir	Âne des Pyrénées
Noune1F	Noune	Âne Grand Noir du Berry
Usc1F	Uscope	Âne Grand Noir du Berry
Valen1F	Valence	Âne de Provence
Valou1F	Valouse	Âne de Provence
Noir1-1F	Cheval Noir n°1	
Noir4-1F	Cheval Noir n°4	
Bai1F	Cheval Bai	

Les noms des ânes ainsi que leur race seront toujours indiqués lorsqu'il existe un ou des SNP dans la séquence proposée. L'absence de tableau indique qu'aucune mutation n'a été mise en évidence dans la séquence.

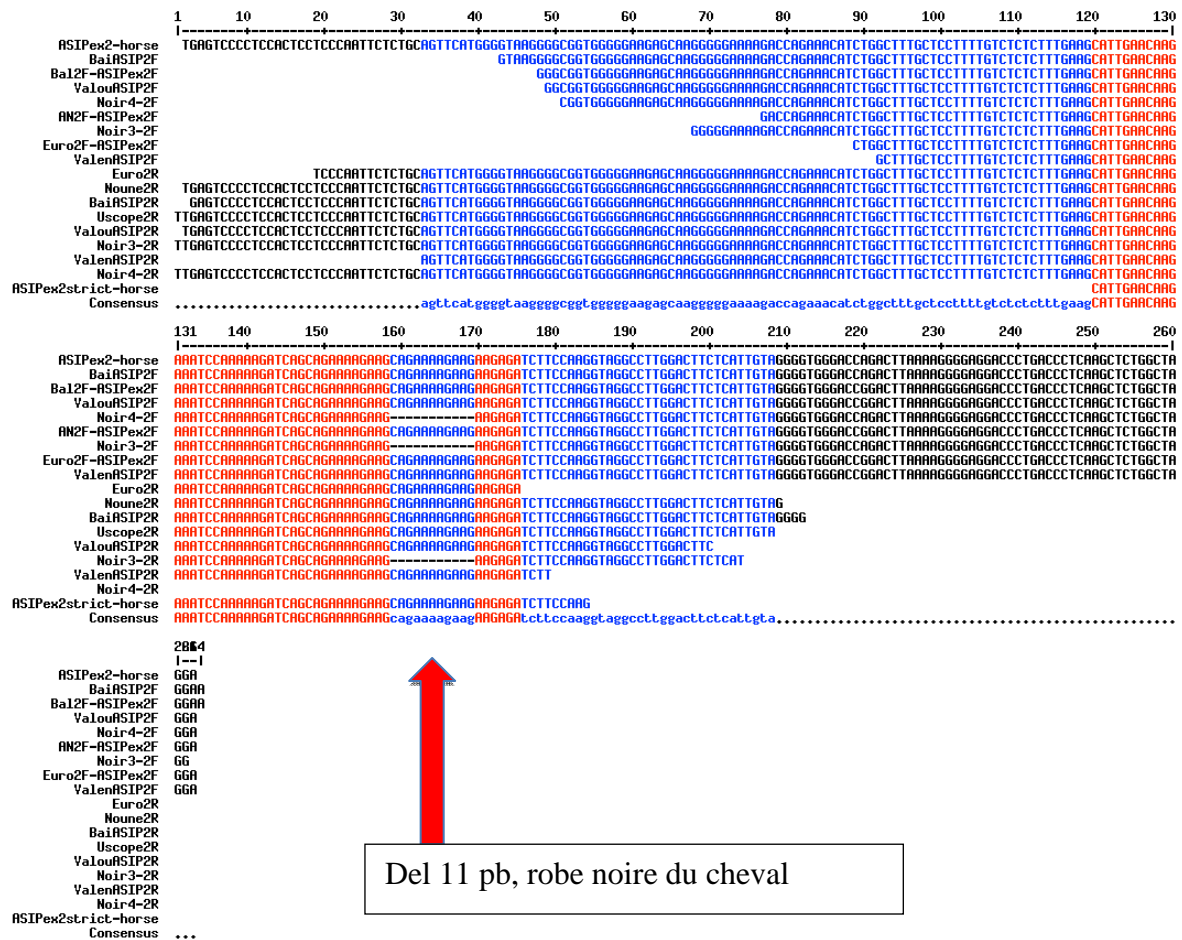
Les SNP entre ânes sont indiqués sur les alignements par une pastille rouge,  tandis que les SNP entre âne et cheval sont indiqués par un triangle vert . De plus les positions relatives de ces SNP sur les alignements sont indiquées entre parenthèse : (pos 161) ou (161) par exemple.

Annexe 1: Alignement de séquences pour ASIP exon 1 entre 8 ânes et la séquence de référence du cheval

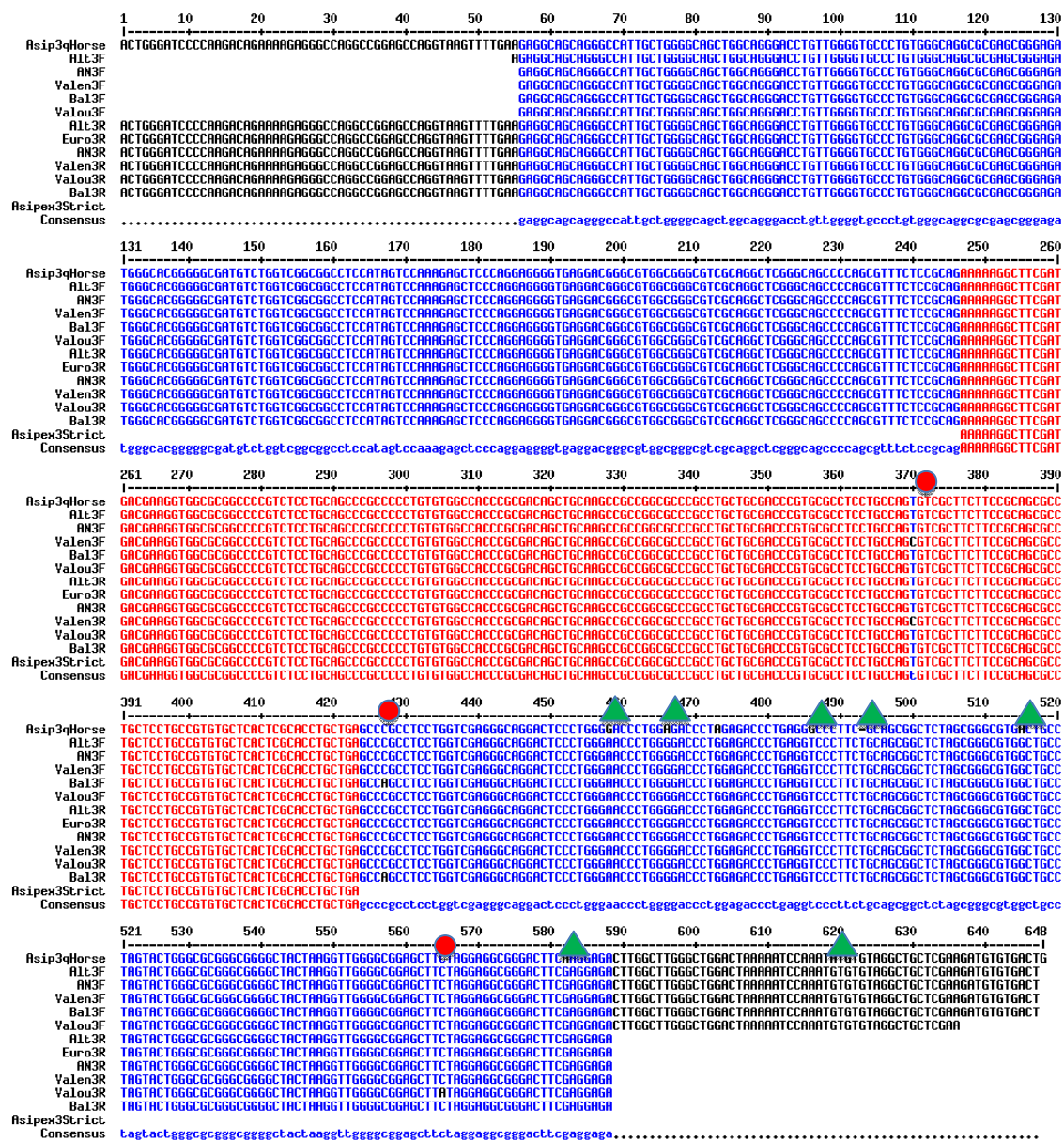
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
ASIPex1Horse	ACCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Noir1-1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Valou1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Valence1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Euro1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Bal1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Noune1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
Uscope1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
AM1R	CCTGCTGACTGCTTCCTGCCCCACACAGTCCCTCTGGGATGGATGTCATTACCTGTTCTG6CCACCCTGCTGGTCAGCCTCTGCTTCCTCAGCTGCTACAGCCACCTGT													CACCTGAGGAGAGGC
All1Fbis														
Valence1F														
Valou1F														
Noir1-1F														
Noune1Fbis														
Euro1Fbis														
ASIPex1strictHorse														
AM1Fbis														
All1R														
Bal1R														
Consensus													ggatgtcattcacctgttctctggccaccctgctggtcagcctctgcttctcctcactgacctacagccacctgtCACCTGAGGAGAGGC
ASIPex1Horse														
Noir1-1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Valou1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Valence1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAA													
Euro1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGT													
Bal1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
Noune1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
Uscope1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
AM1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
All1Fbis	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Valence1F	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Valou1F	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Noir1-1F	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Noune1Fbis	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
Euro1Fbis	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAACTAGCC													
ASIPex1strictHorse	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
AM1Fbis	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
All1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGGTAA													
Bal1R	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG													
Consensus	CCAAAGATGACAGGAGCCTGAGGAGACACTCCCTCCATGARACTGTTGGATCCCTCTGCTCTATCATGGG												

Annexe 1: Alignement de séquences pour ASIP exon 1

Annexe 2 : Alignement de séquences pour *ASIP* exon 2 entre 8 ânes, 2 chevaux noirs et la séquence de référence du cheval



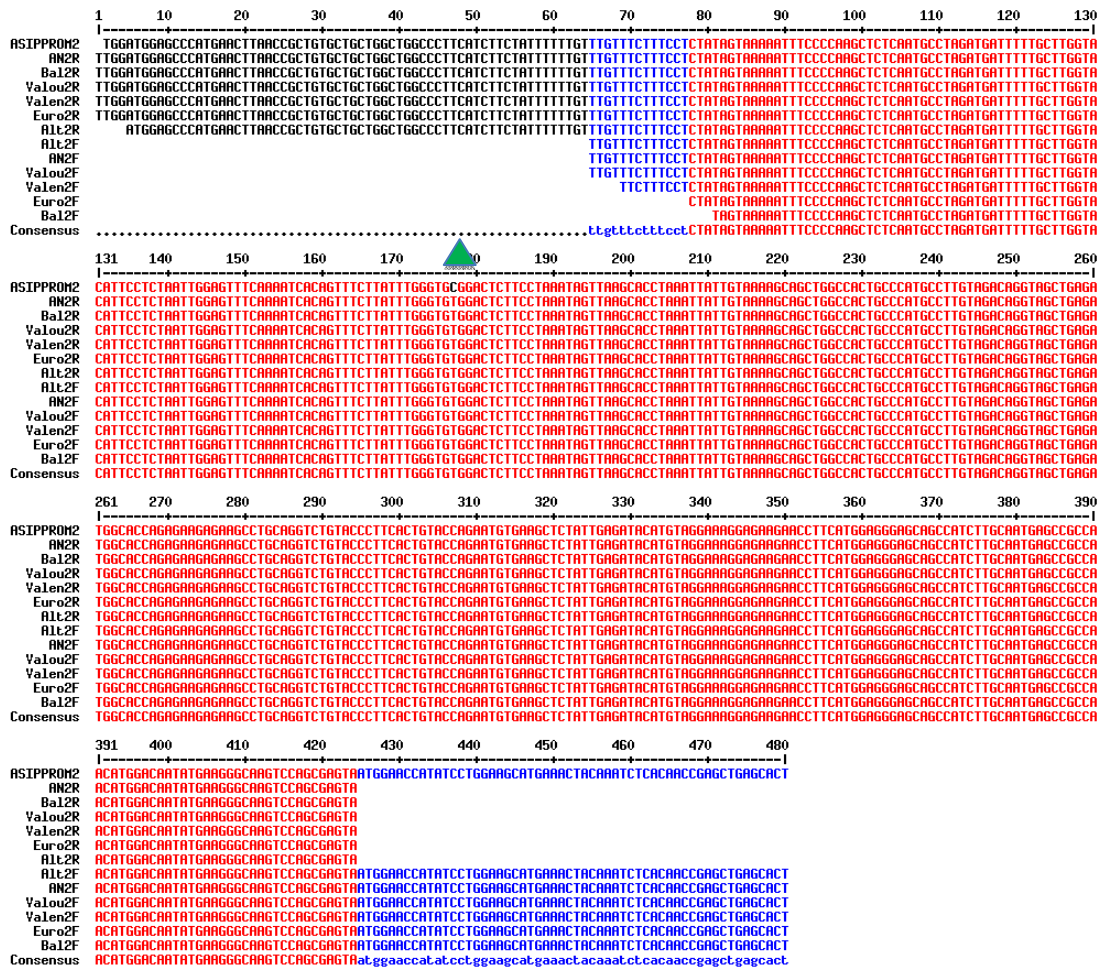
Annexe 3: Alignement de séquences pour ASIP exon 3 entre 6 ânes et la séquence de référence du cheval



Annexe 3: Alignement de séquences pour ASIP exon 3

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 370)	SNP 2 (pos 427)	SNP 3 (pos 565)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	T	C/A	C	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	T	C	C	1 (pos 458)	G	A
Pyrénées	Aigle Noir	T	C	C	2 (pos 466)	A	G
Pyrénées	Altesse	T	C	C	3 (pos 473)	A	G
Provence	Valence	C	C	C	4 (pos 486)	G	T
Provence	Valouse	T	C	A/C	5 (pos 494)	-	T
Cheval	Ensembl	T	C	C	6 (pos 515)	A	G
					7 (pos 582)	A	A

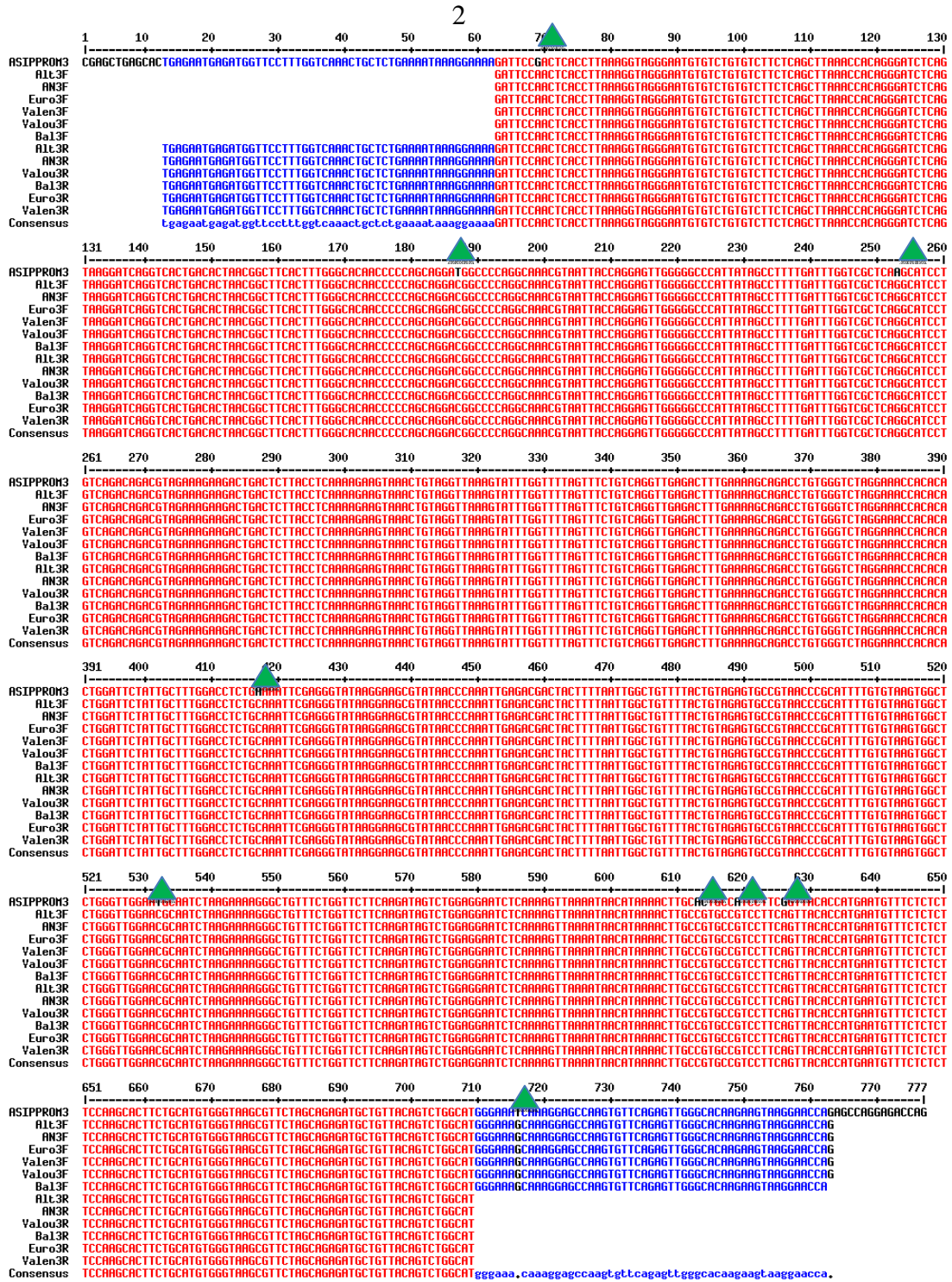
Annexe 4: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 2 entre les ânes témoins et la séquence de référence du cheval



Annexe 4: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 2

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 177)	C	T

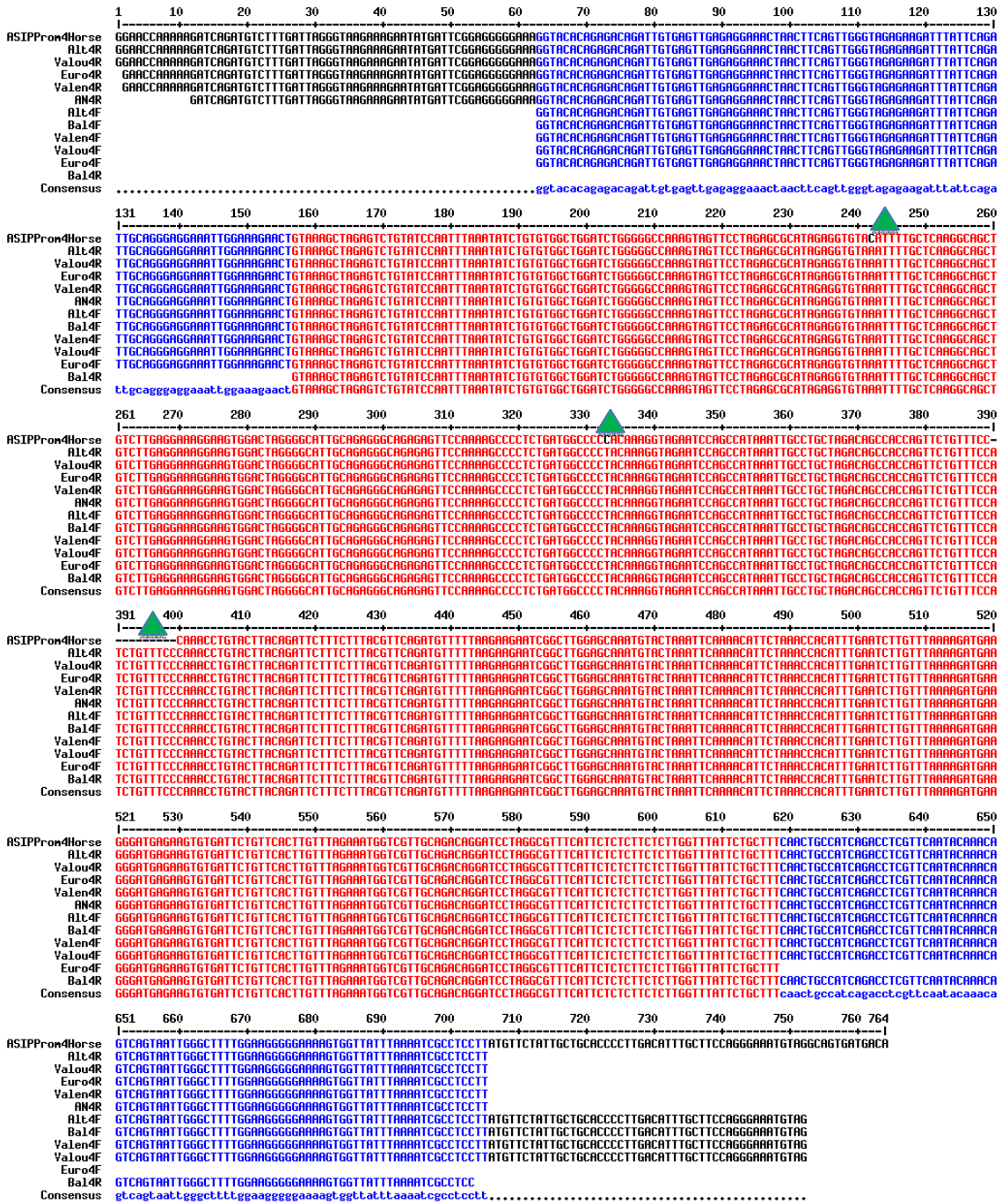
Annexe 5: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 3 entre les ânes témoins et la séquence de référence du cheval




SNP Cheval/Âne								
Position	Cheval	Ânes	Position	Cheval	Ânes	Position	Cheval	Ânes
1 (pos 69)	G	A	4 (pos 417)	A	C	7 (pos 619)	A	G
2 (pos 187)	T	C	5 (pos 532)	T	C	8 (pos 626)	G	A

3 (pos 253)	A	G	6 (613-614)	AC	CG	9 (pos 715)	T	G
-------------	---	---	-------------	----	----	-------------	---	---

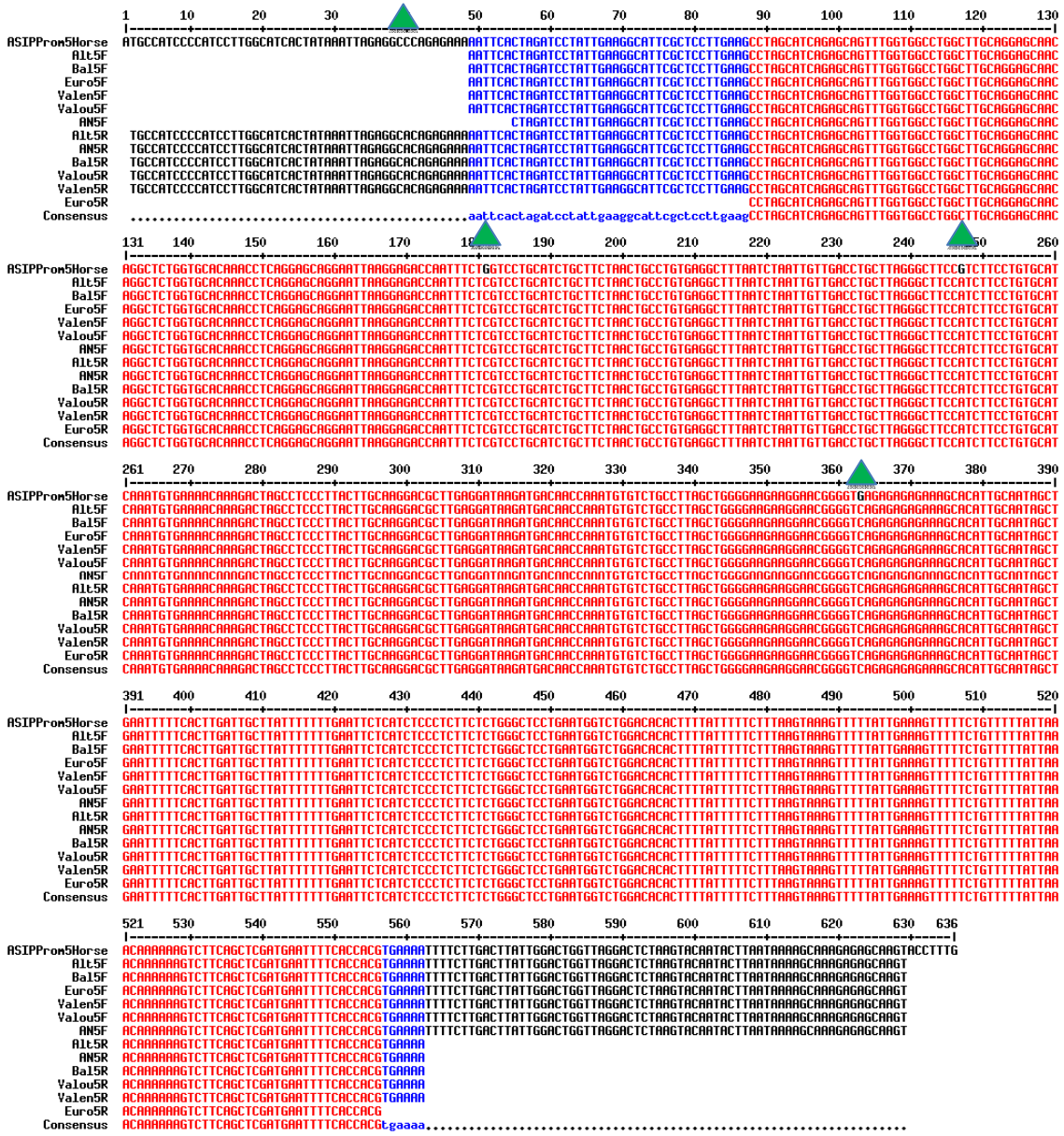
Annexe 6: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 4 entre les ânes témoins et la séquence de référence du cheval



Annexe 6: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 4

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 242)	C	A
2 (pos 333)	C	T
3 (pos 390-400)	-----	ATCTGTTCC

Annexe 7: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 5 entre les ânes témoins et la séquence de référence du cheval

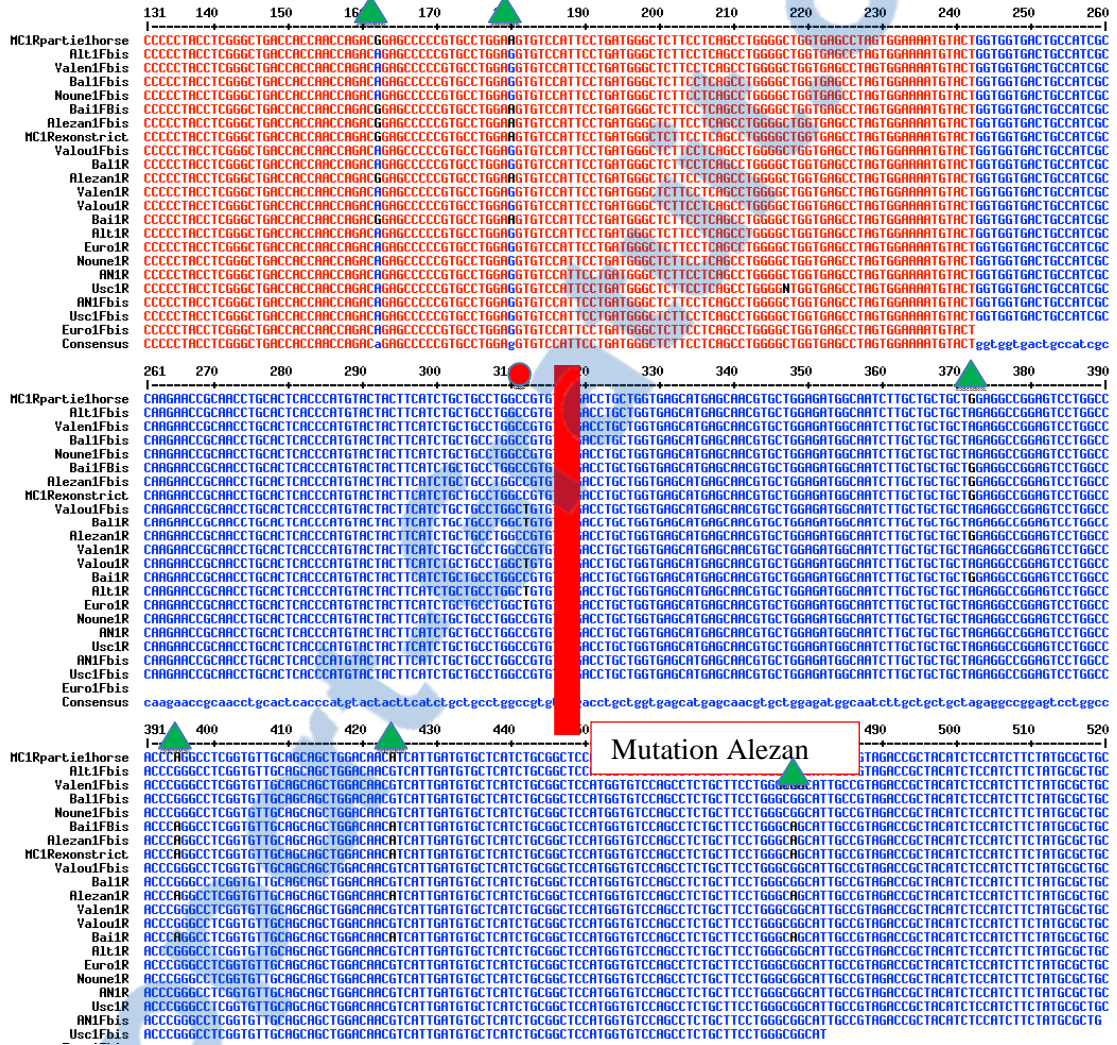


Annexe 7: Alignement de séquences pour ASIP Promoteur partie 5

SNP/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 40)	C	A
2 (pos 181)	G	C
3 (pos 247)	G	A
4 (pos 363)	G	C

Annexe 8 : Alignement de séquences pour MC1R partie 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données

En raison de sa taille importante de 1079 paires de bases chez le cheval en un seul exon, MC1R a été séquencé en deux parties dont nous avons par la suite vérifié le bon chevauchement.

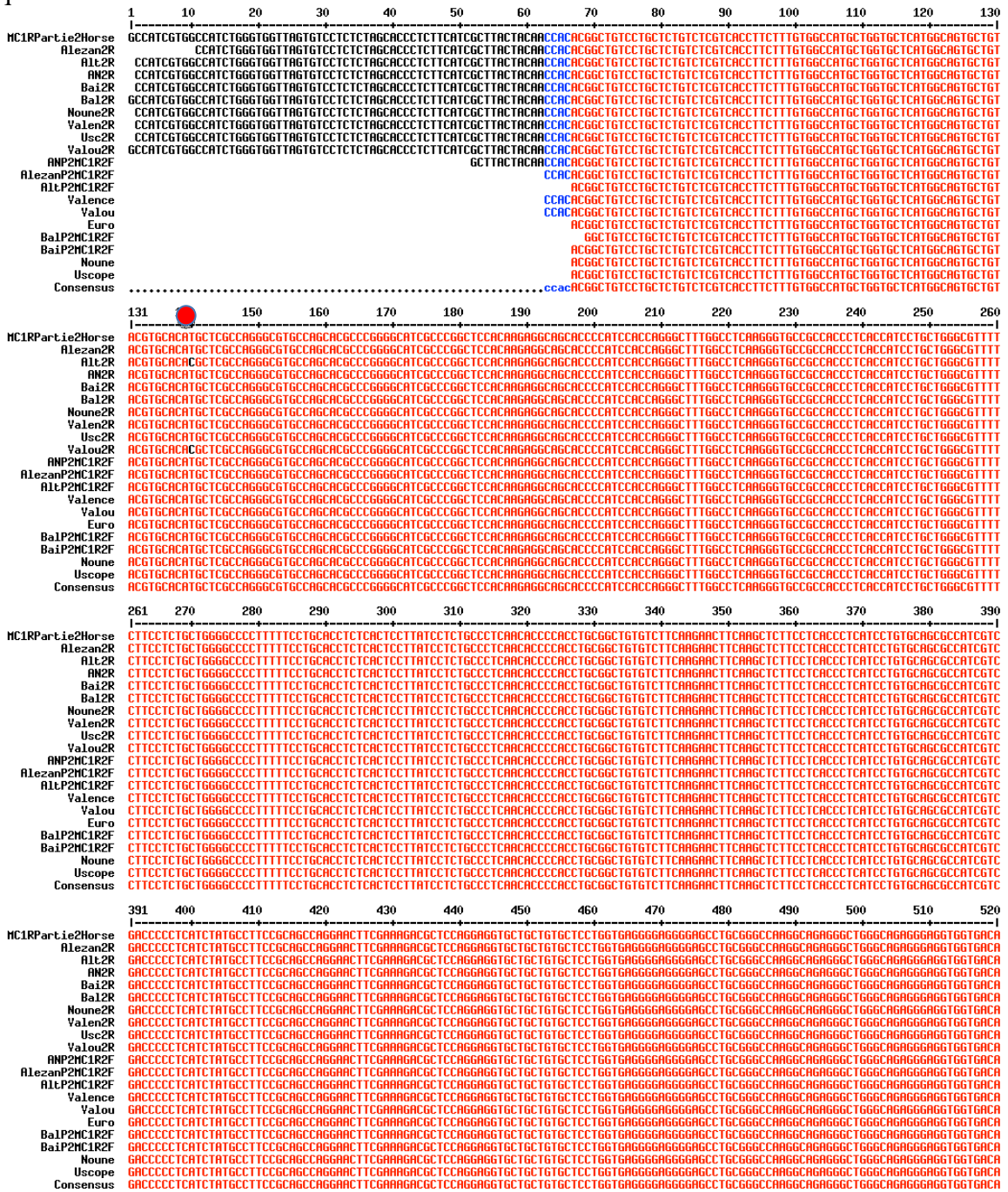


Annexe 8: Alignement de séquences pour MC1R partie 1

SNP entre ânes	SNP 1 (pos 312)	SNP Cheval/Âne
Normand	Balthazar	C/T
Normand	Euro	C/T
Pyrénées	Aigle Noir	C/T
Pyrénées	Altesse	C/T
Grand Noir du Berry	Noune	C/C
Grand Noir du Berry	Uscope	C/C
Provence	Valence	C/C
Provence	Valouse	C/T
Cheval	Ensembl	C
Cheval	CV Bai	C/C

Cheval	CV Alezan	C/C
--------	-----------	-----

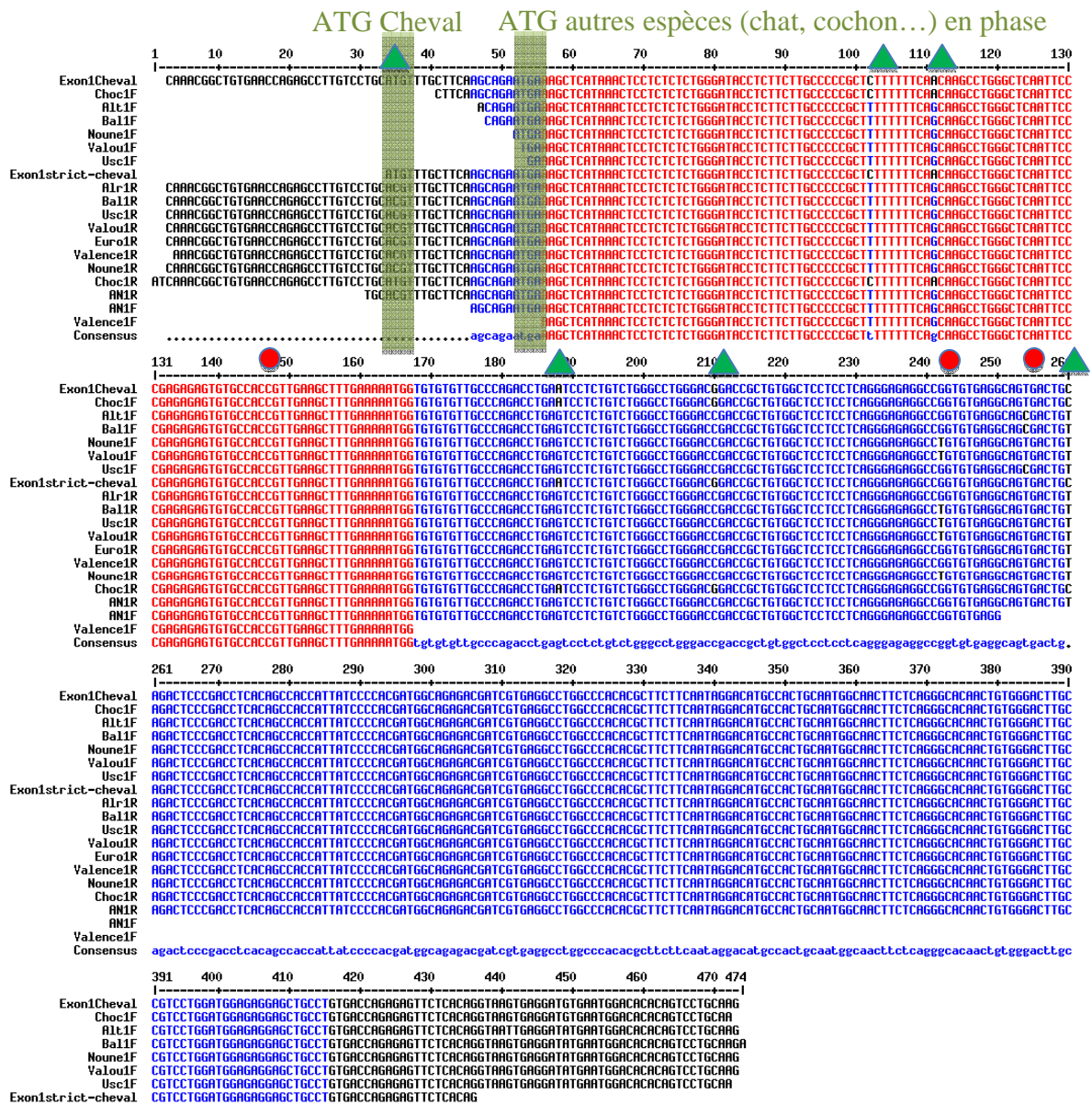
Annexe 9 : Alignement de séquences pour MC1R partie 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 9: Alignement de séquences pour MC1R partie 2

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 140)			
Normand	Balthazar	T/T	Grand Noir du Berry	Uscope	T/T
Normand	Euro	T/T	Provence	Valence	T/T
Pyrénées	Aigle Noir	T/T	Provence	Valouse	C/T
Pyrénées	Altesse	C/T	Cheval	Ensembl	T
Grand Noir du Berry	Noune	T/T	Cheval	CV Bai	T/T
Grand Noir du Berry	Uscope	T/T	Cheval	CV Alezan	T/T

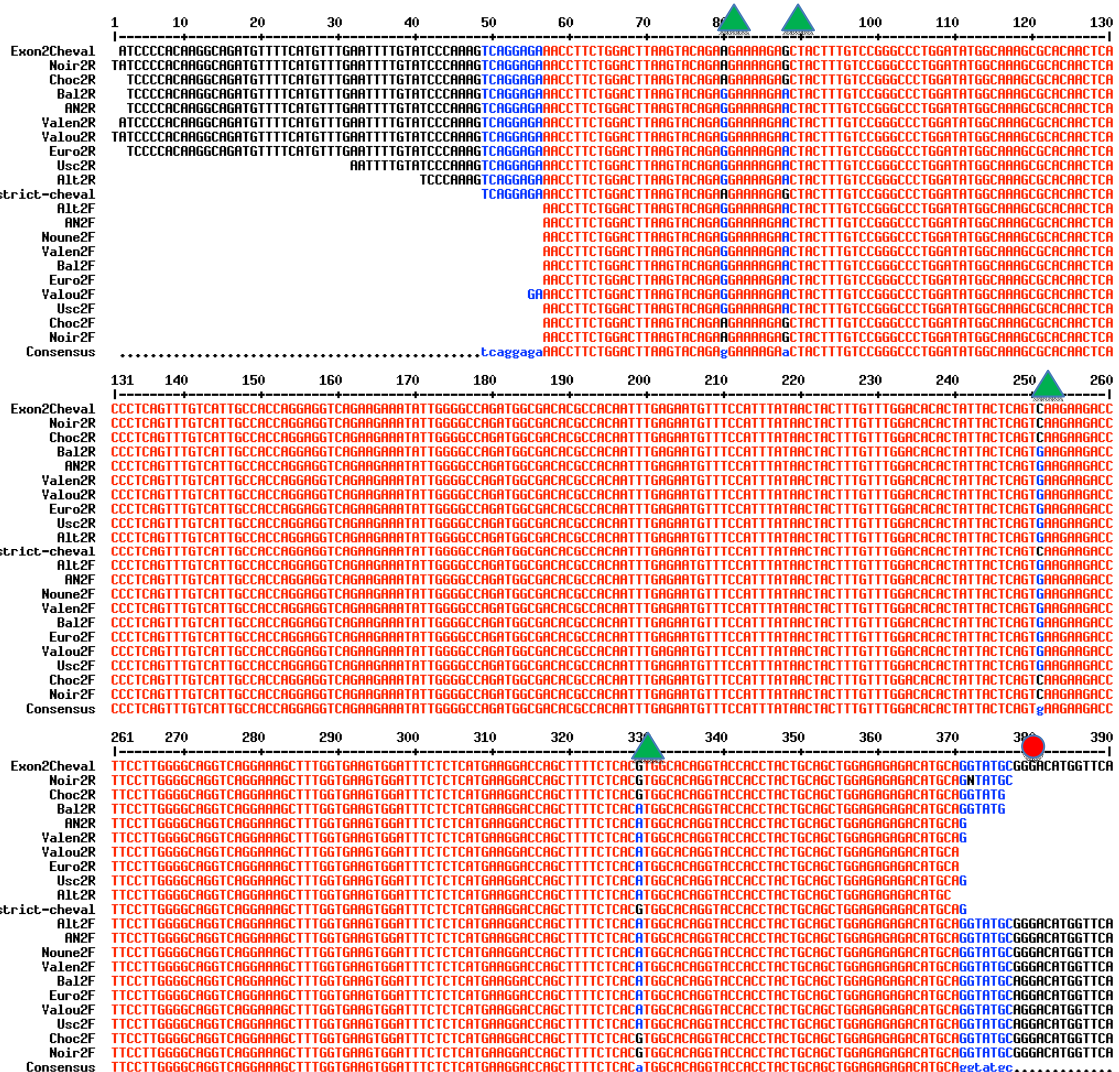
Annexe 10: Alignement de séquences pour *TYRPI* exon 1



Annexe 10: Alignement de séquences pour *TYRPI* exon 1

SNP entre ânes		SNP 1 (148)	SNP 2 (242)	SNP 3 (254)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G/G	G/T	C/T	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	G/G	G/T	C/T	1 (35)	T	C
Pyrénées	Aigle Noir	G/G	G/T	T/T	2 (102)	C	T
Pyrénées	Altesse	G/G	G/G	C/T	3 (111)	A	G
Grand Noir du Berry	Noune	G/G	T/T	T/T	4 (188)	A	G
Grand Noir du Berry	Uscope	G/A	G/T	C/T	5 (210)	G	C
Provence	Valence	G/G	G/T	T/T	6 (260)	C	T
Provence	Valouse	G/G	T/T	T/T			
Cheval	Ensembl	G/G	G	T/T			
Cheval	CV Chocolat	G/G	G/G	T/T			

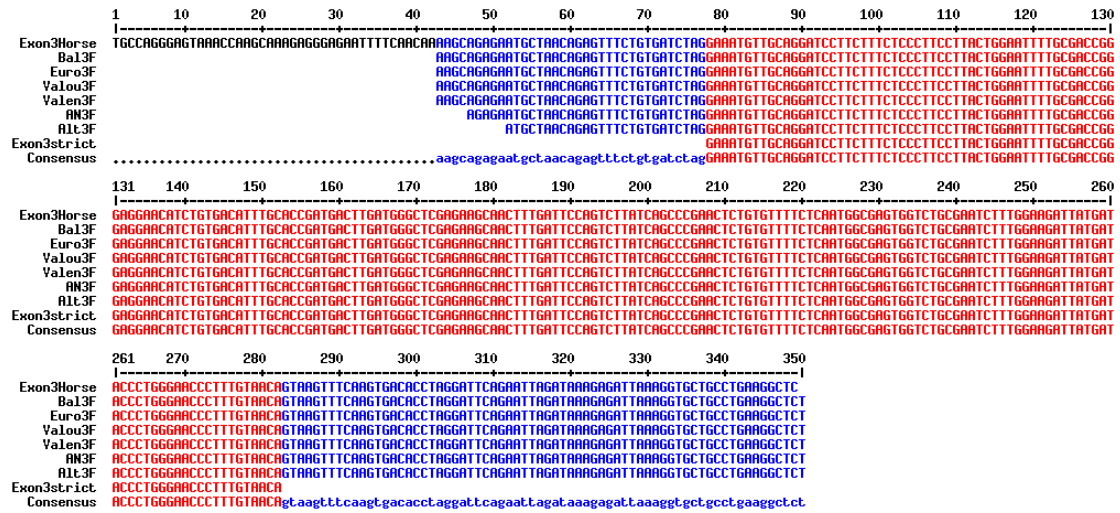
Annexe 11: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 11: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 2

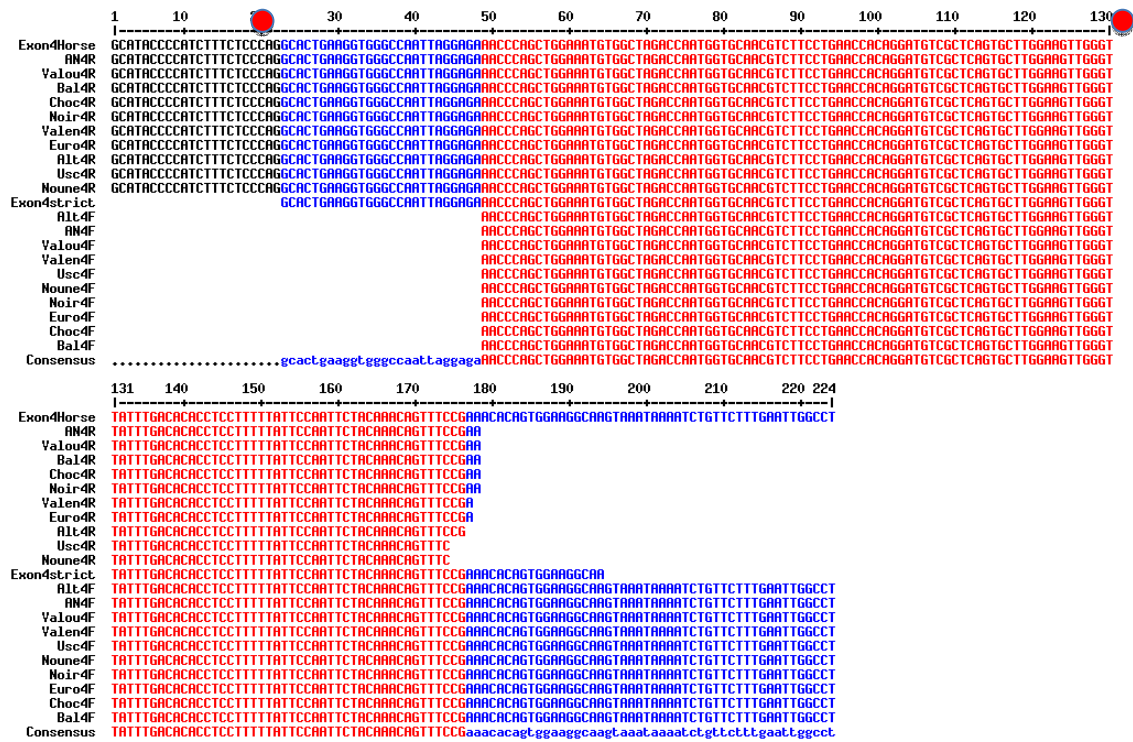
SNP entre ânes		SNP 1 (pos 378)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G/A	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	G/A	1 (pos 80)	A	G
Pyrénees	Aigle Noir	G/G	2 (pos 88)	G	G
Pyrénees	Altesse	G/G	3 (pos 251)	C	G
Grand Noir du Berry	Noune	G/A	4 (pos 329)	G	A
Grand Noir du Berry	Uscope	G/A			
Provence	Valence	G/A			
Provence	Valouse	A/A			
Cheval	Ensembl	G			
Cheval	CV Chocolat	G/G			

Annexe 12: Alignement de séquences pour *TYRPI* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 12: Alignement de séquences pour *TYRPI* exon 3

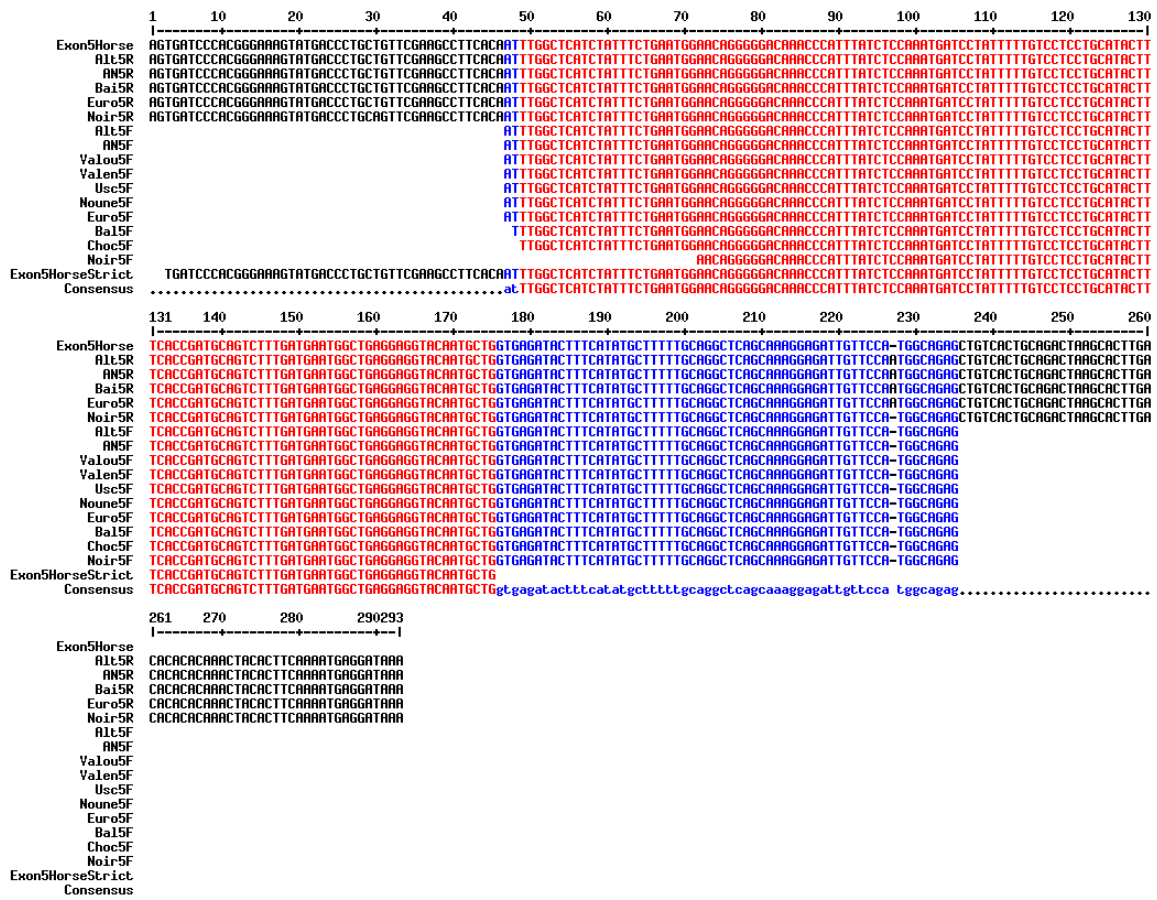
Annexe 13 : Alignement de séquences pour *TYRPI* exon 4 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 13: Alignement de séquences pour *TYRPI* exon 4

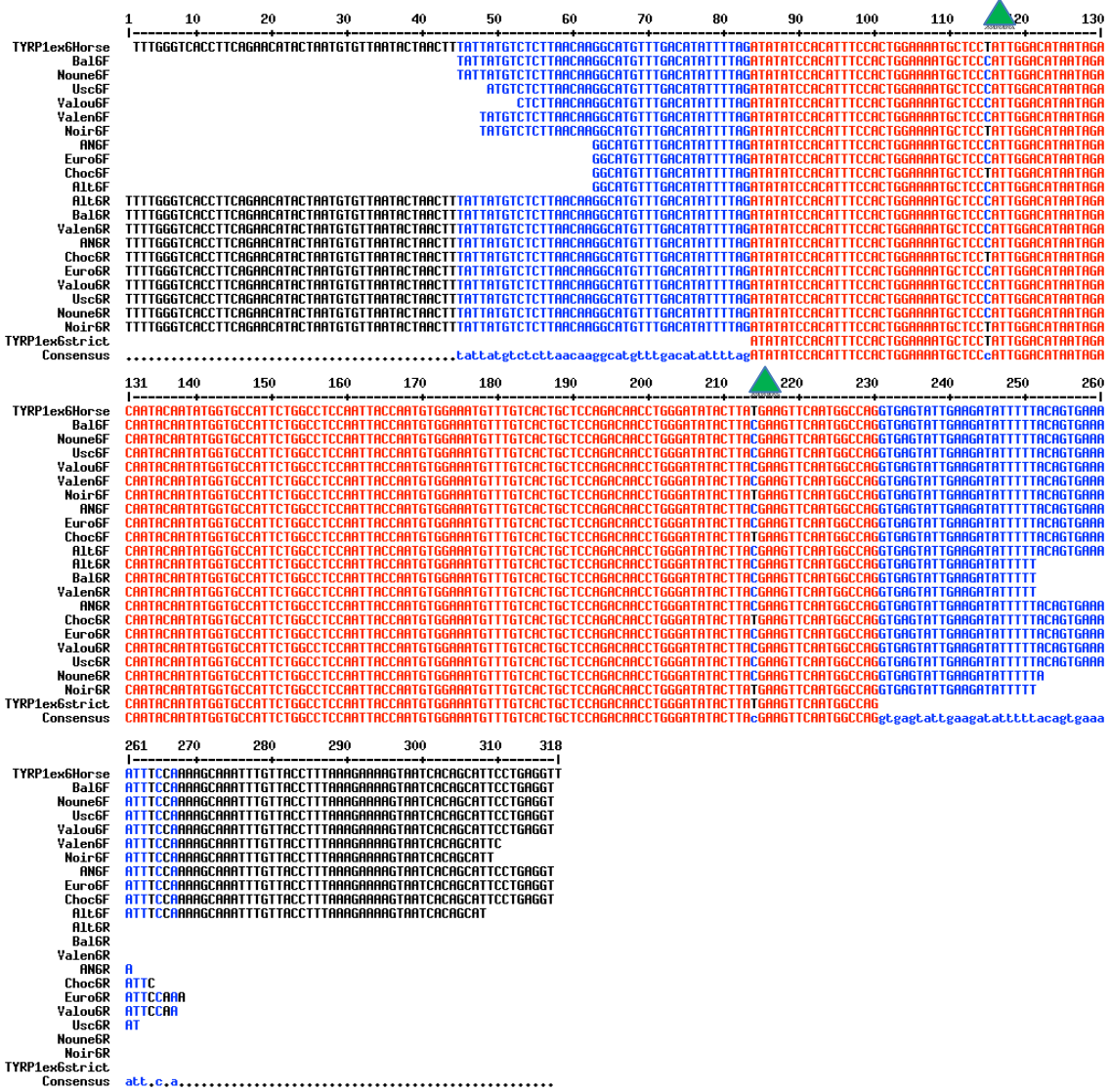
SNP entre ânes		SNP 1 (pos 20)	SNP 2 (pos 129)
Normand	Balthazar	C	G
Normand	Euro	C	G/T
Pyrénées	Aigle Noir	C	G
Pyrénées	Altesse	C	G
Grand Noir du Berry	Noune	C	G
Grand Noir du Berry	Uscope	C	G
Provence	Valence	C/T	G
Provence	Valouse	C	G
Cheval	Ensembl	C	G

Annexe 14: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 5 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 14: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 5

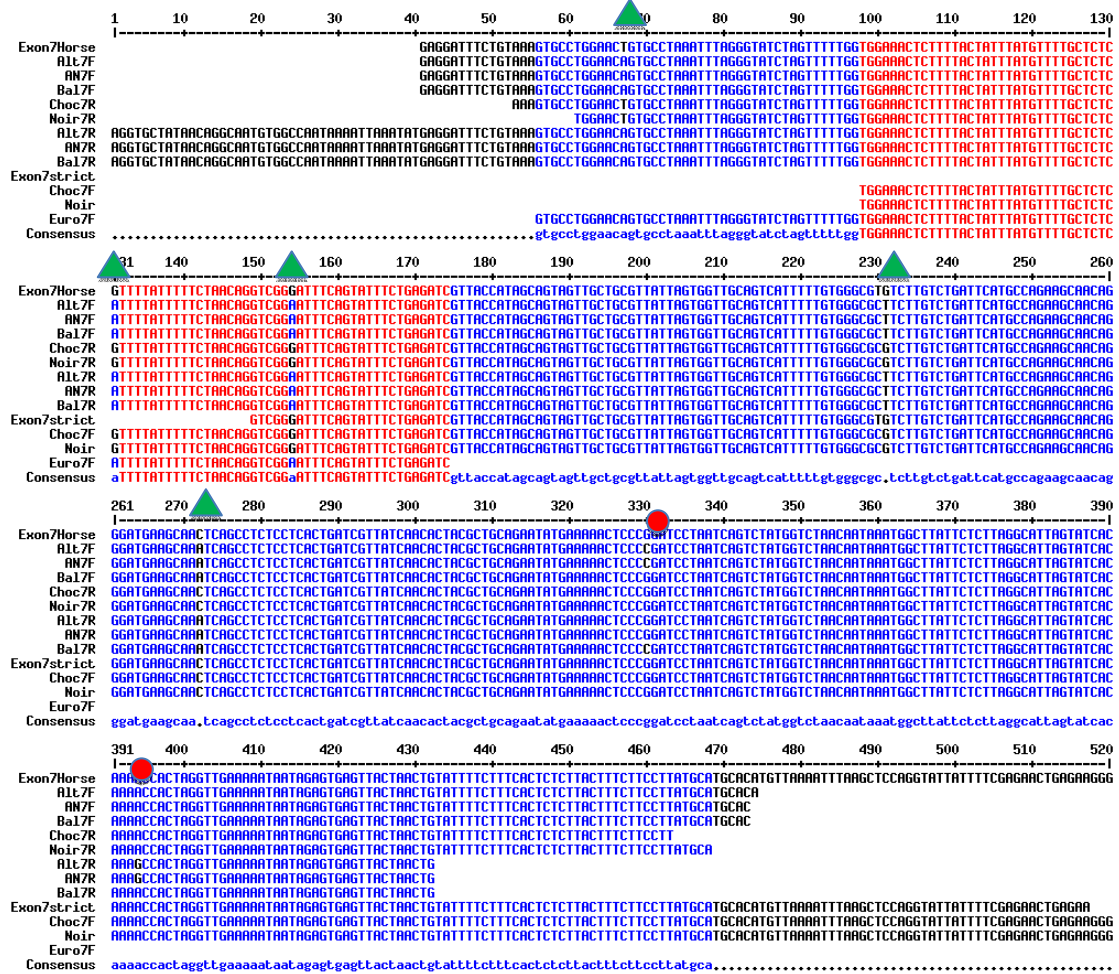
Annexe 15: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 15: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 6

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 115)	T	C
2 (pos 214)	T	C

Annexe 16: Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 7



Annexe 16 : Alignement de séquences pour *TYRP1* exon 7

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 330)	SNP 2 (pos 394)	SNP Cheval/Âne		
				Position	Cheval	Ânes
Normand	Balthazar	C/G	A/A	1 (pos 67)	T	A
Normand	Euro	G	A	2 (pos 131)	G	A
Pyrénées	Aigle Noir	C/G	A/G	3 (pos 154)	G	A
Pyrénées	Altesse	C/G	A/G	4 (pos 231)	G	T
Grand Noir du Berry	Noune	G	A	5 (pos 272)	C	A
Grand Noir du Berry	Uscope	G	A			
Provence	Valence	G	A			
Provence	Valouse	G	A			
Cheval	Ensembl	C	G			

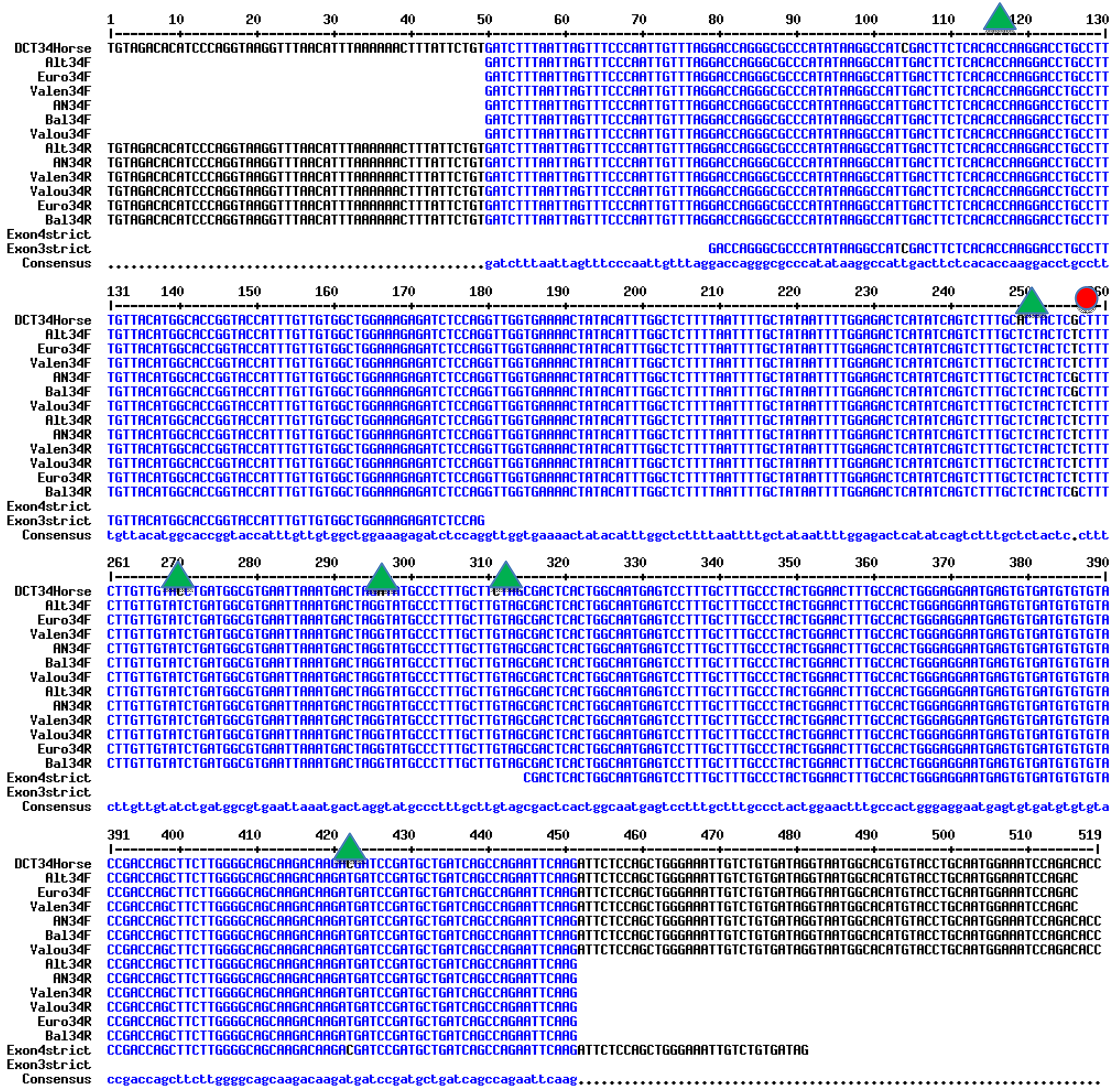
Annexe 17: Alignement de séquences pour *DCT* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 17 : Alignement de séquences pour *DCT* exon 1

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 238)	SNP 2 (pos 319)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G/A	G/A	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	G/A	A	1 (pos 138)	A	G
Pyrénées	Altesse	G/A	G/A	2 (pos 147)	C	T
Provence	Valence	G/A	G/A	3 (pos 252)	G	A
Provence	Valouse	G/A	A	4 (pos 322)	T	C
Cheval	Ensembl	G	G			

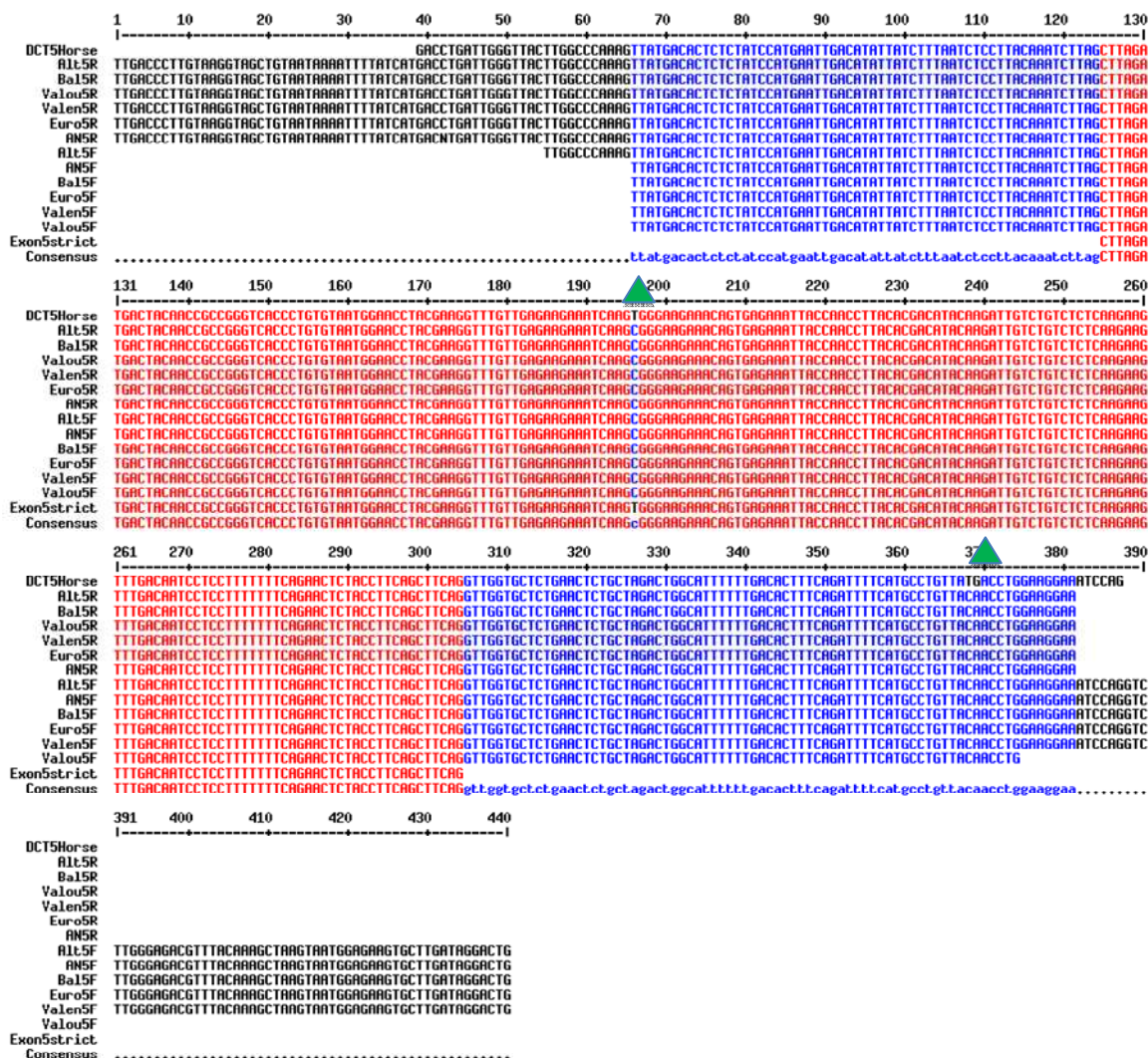
Annexe 19 : Alignement de séquences pour DCT exons 3 et 4 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 19: Alignement de séquences pour DCT exons 3 et 4

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 256)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	T	1 (pos 114)	C	T
Pyrénées	Aigle Noir	G	2 (pos 249)	A	T
Pyrénées	Altesse	G/T	3 (pos 270)	C	T
Provence	Valence	G/T	4 (pos 296)	A	G
Provence	Valouse	T	5 (pos 311)	C	G
Cheval	Ensembl	G	6 (pos 422)	C	T

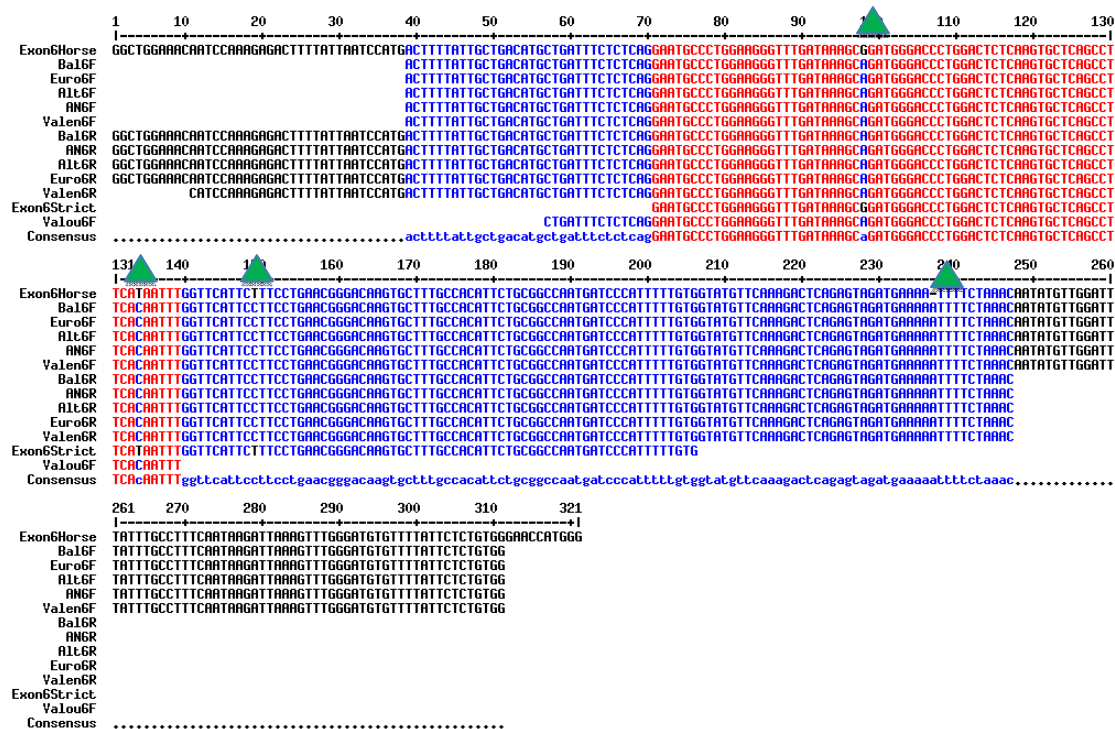
Annexe 20 : Alignement de séquences pour *DCT* exon 5 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 20: Alignement de séquences pour *DCT* exon 5

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 196)	T	C
2 (pos 368-369)	TG	CA

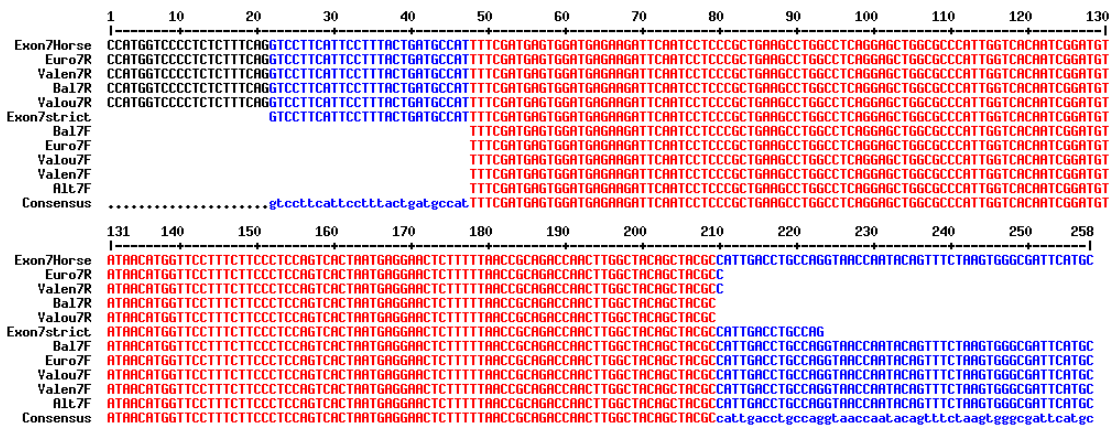
Annexe 21: Alignement de séquences pour *DCT* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



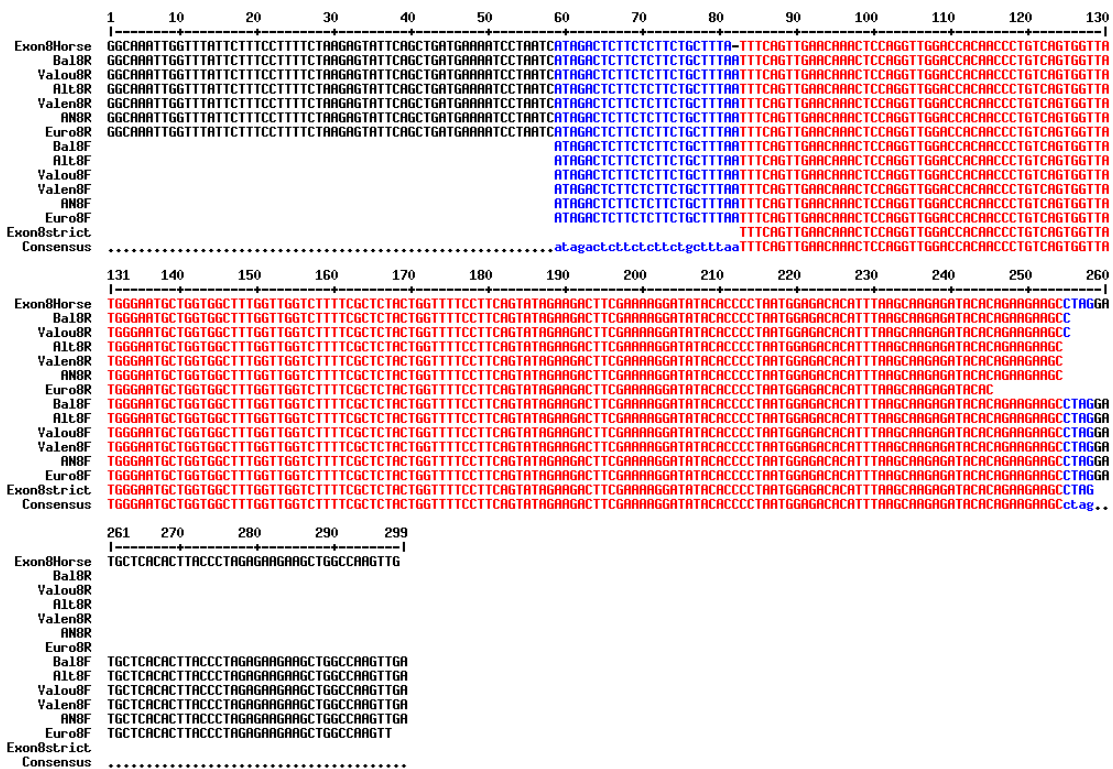
Annexe 21: Alignement de séquences pour *DCT* exon 6

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 98)	G	A
2 (pos 134)	T	C
3 (pos 149)	T	C
4 (pos 237)	-	A

Annexe 22 et Annexe 23: Alignement de séquences pour *DCT* exons 7 et 8 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données

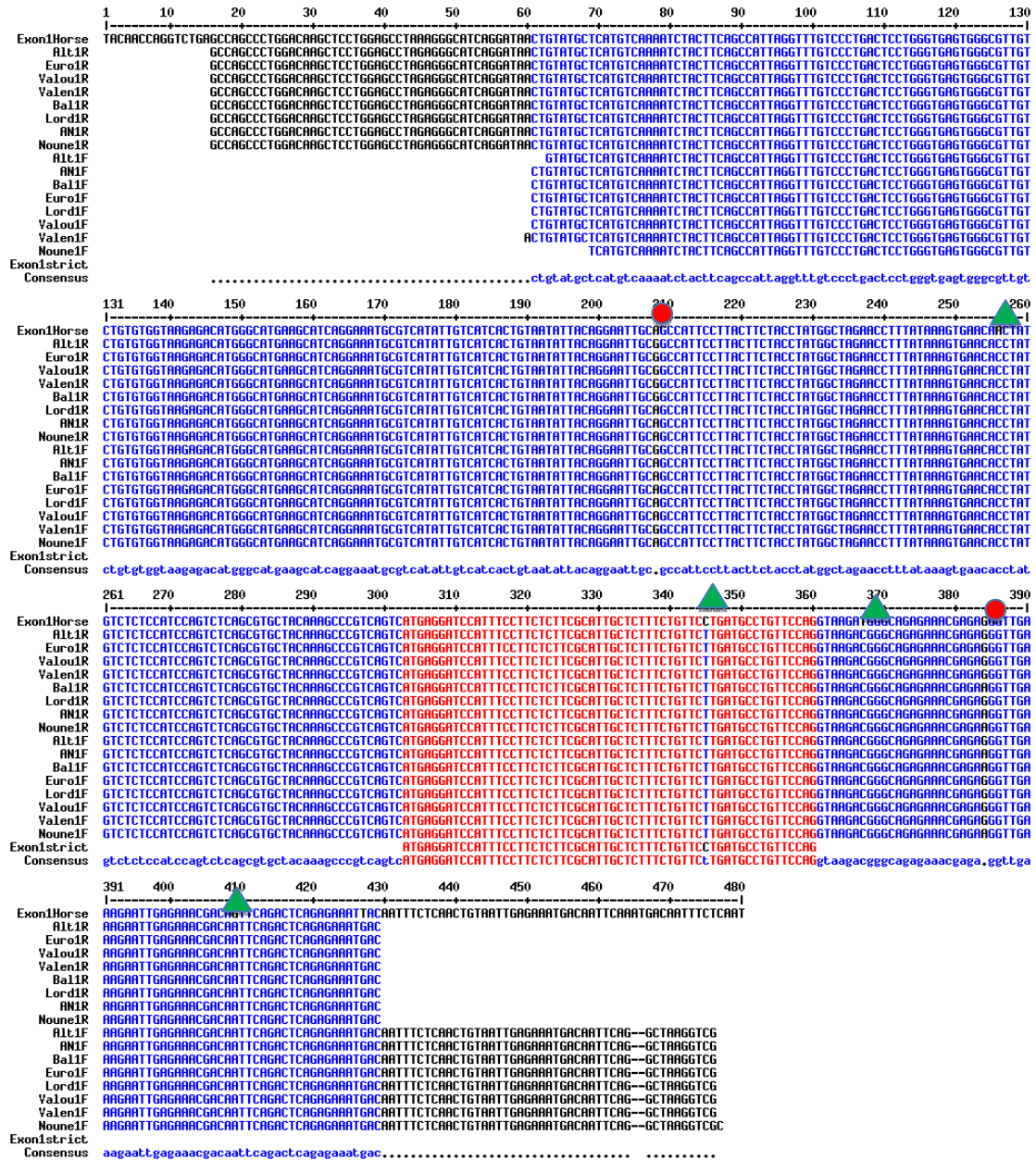


Annexe 22: Alignement de séquences pour *DCT* exon 7



Annexe 23: Alignement de séquences pour *DCT* exon 8

Annexe 24: Alignement de séquences pour *BD103* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données

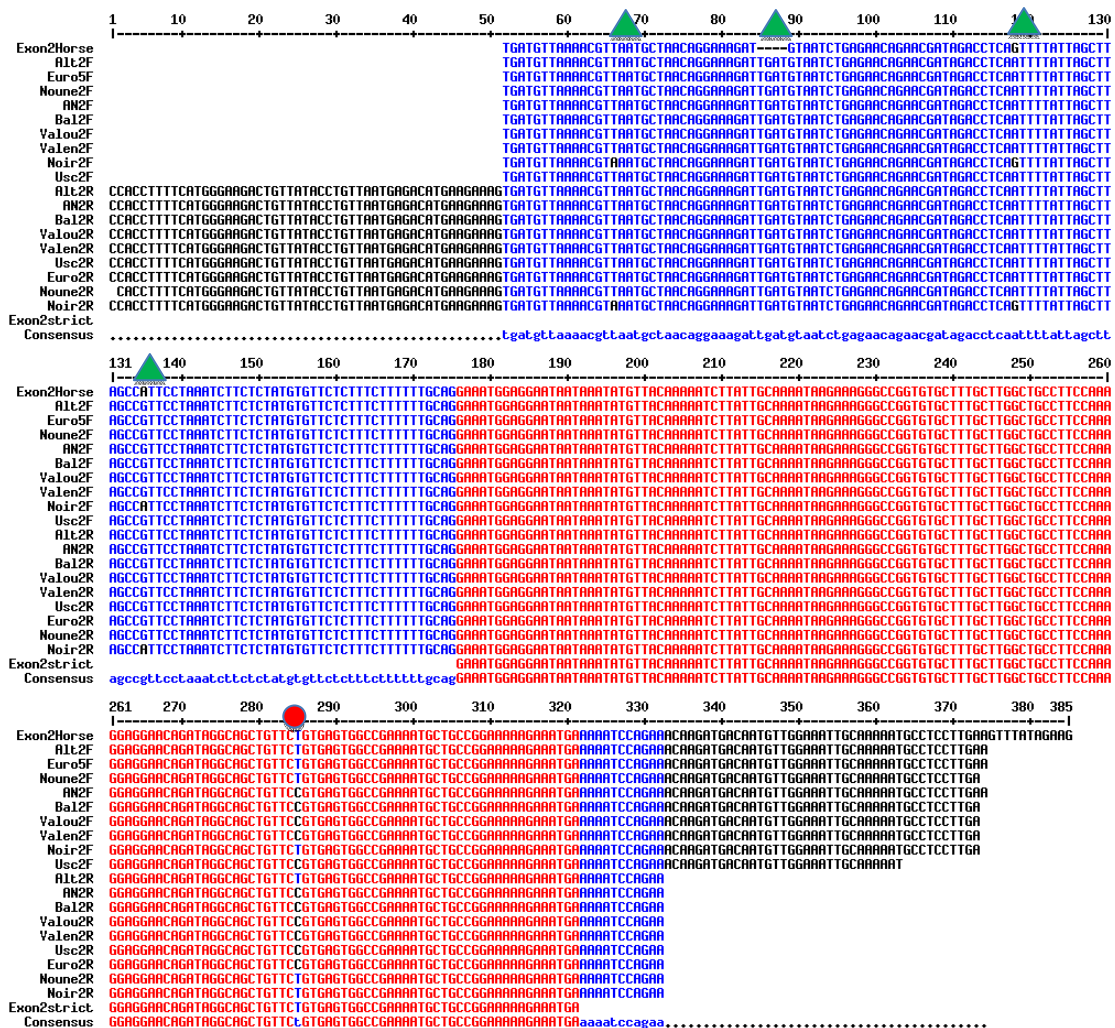


Annexe 24: Alignement de séquences pour *BD103* exon 1

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 208)	SNP 2 (pos 384)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G/A	G/A	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	G/A	G/G	1 (pos 256)	A	C
Pyrénées	Aigle Noir	A/A	G/A	2 (pos 345)	C	T
Pyrénées	Altresse	G/G	G/G	3 (pos 367)	T	C
Grand Noir du Berry	Lord	A/A	G/G	4 (pos 409)	G	A
Grand Noir du Berry	Noune	G/A	G/A			
Provence	Valence	G/A	G/G			
Provence	Valouse	G/A	G/G			

Cheval	Ensembl	G	G
--------	---------	---	---

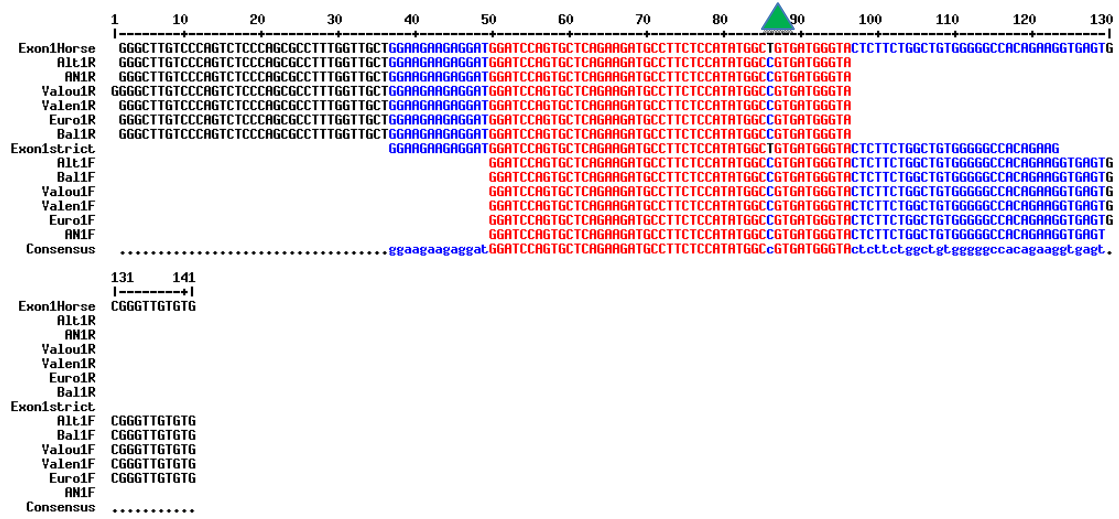
Annexe 25: Alignement de séquences pour *BDI03* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 25: Alignement de séquences pour *BDI03* exon 2

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 285)	SNP Cheval/Âne		
			Position	Cheval	Ânes
Normand	Balthazar	C/T	1 (pos 66)	A	T
Normand	Euro	C/T	2 (pos 85-88)	-	TGAT
Pyrénées	Aigle Noir	C	3 (pos 118)	G	A
Pyrénées	Altesse	T	4 (pos 135)	A	G
Grand Noir du Berry	Uscope	C			
Grand Noir du Berry	Noune	T			
Provence	Valence	C/T			
Provence	Valouse	C/T			
Cheval	Ensembl	T			

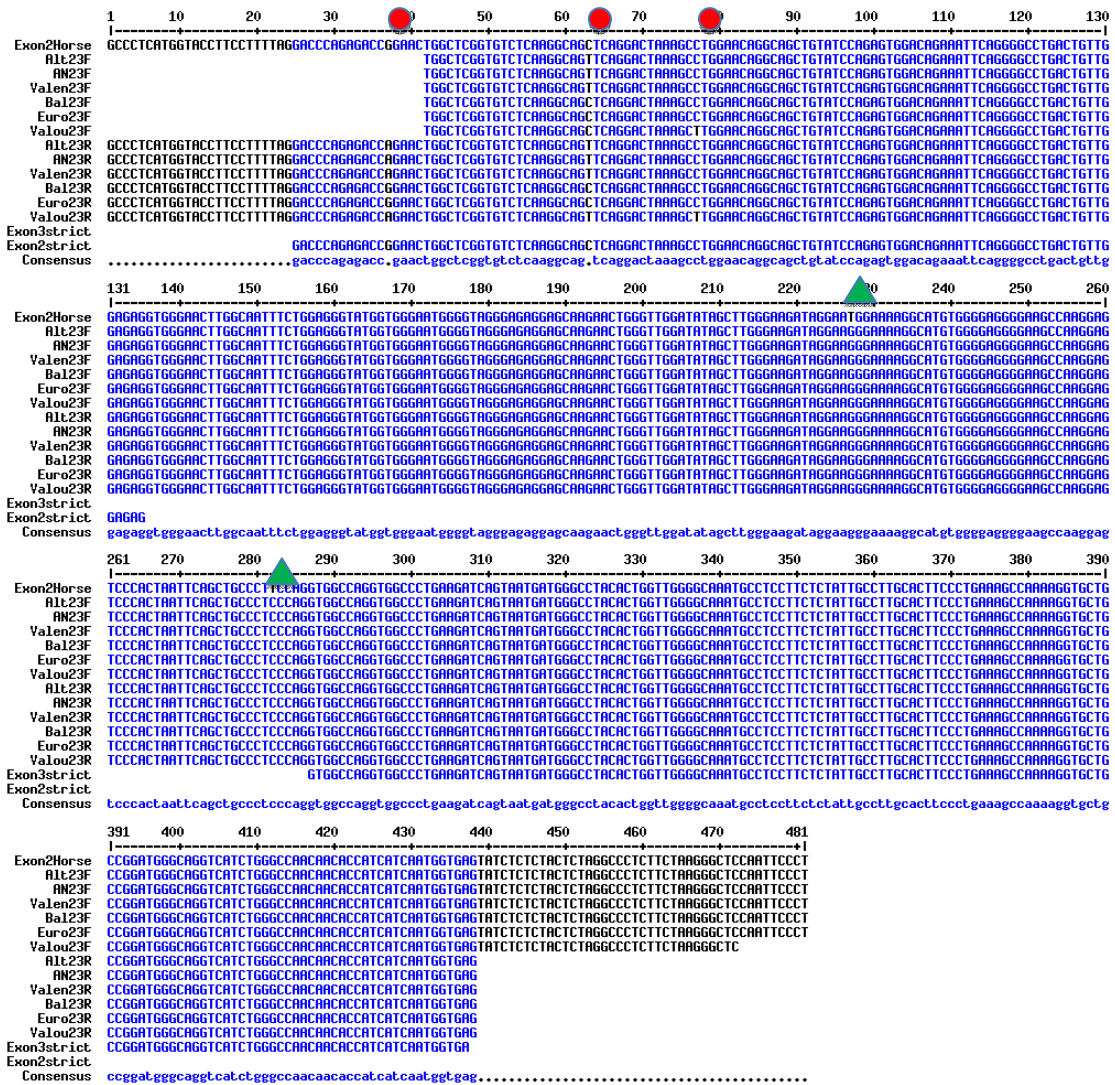
Annexe 26 : Alignement de séquences pour *PMEL* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 26: Alignement de séquences pour *PMEL* exon 1

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 86)	T	C

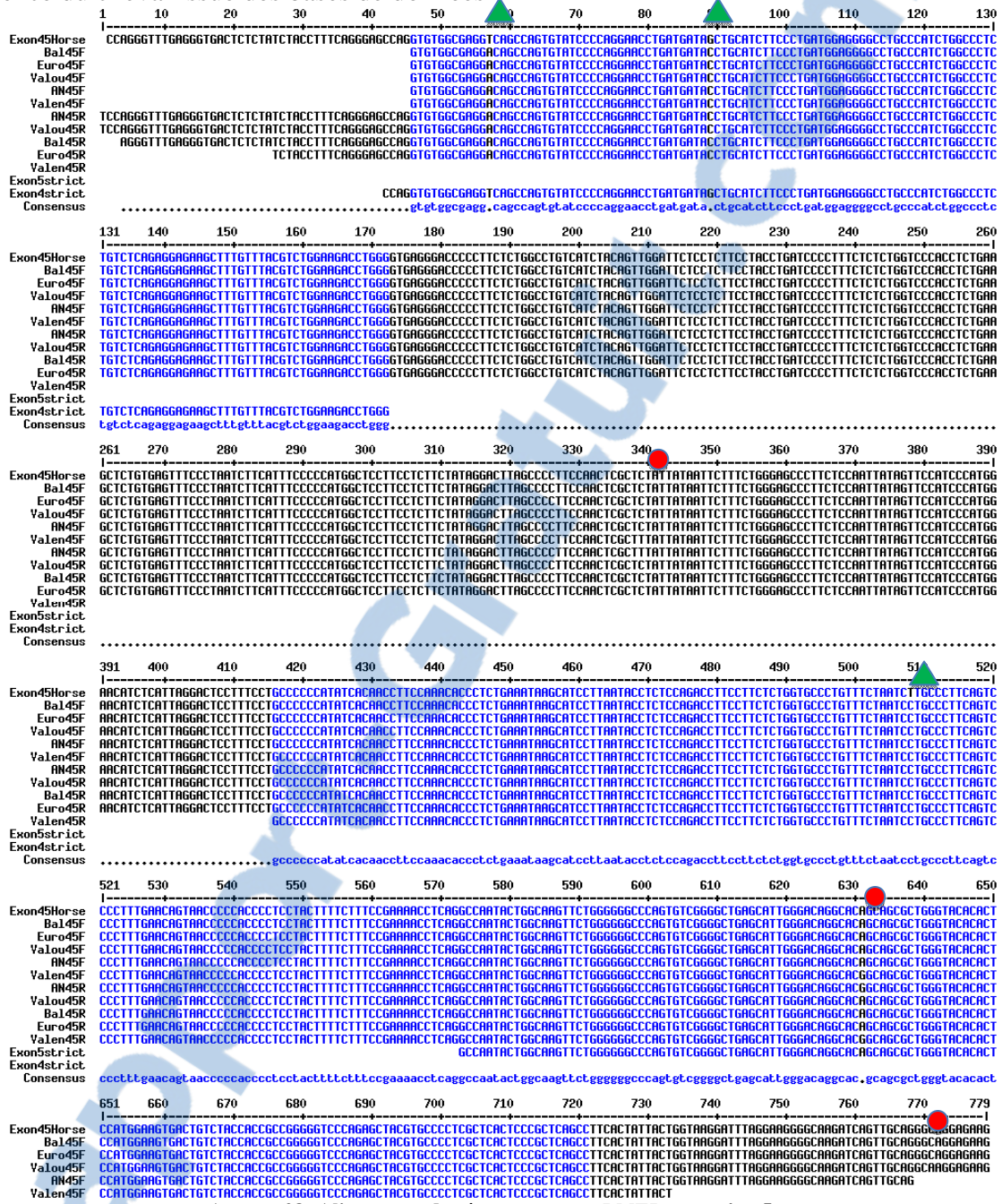
Annexe 27: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 2 et 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 27: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 2 et 3

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 37)	SNP 2 (pos 63)	SNP 3 (pos 77)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G	C	C	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	G	C	C	1 (pos 227)	T	G
Pyrénées	Aigle Noir	A	T	C	2 (pos 282)	T	C
Pyrénées	Altesse	A	C/T	C			
Provence	Valence	A	T	C			
Provence	Valouse	G/A	C/T	C/T			
Cheval	Ensembl	G	C	C			

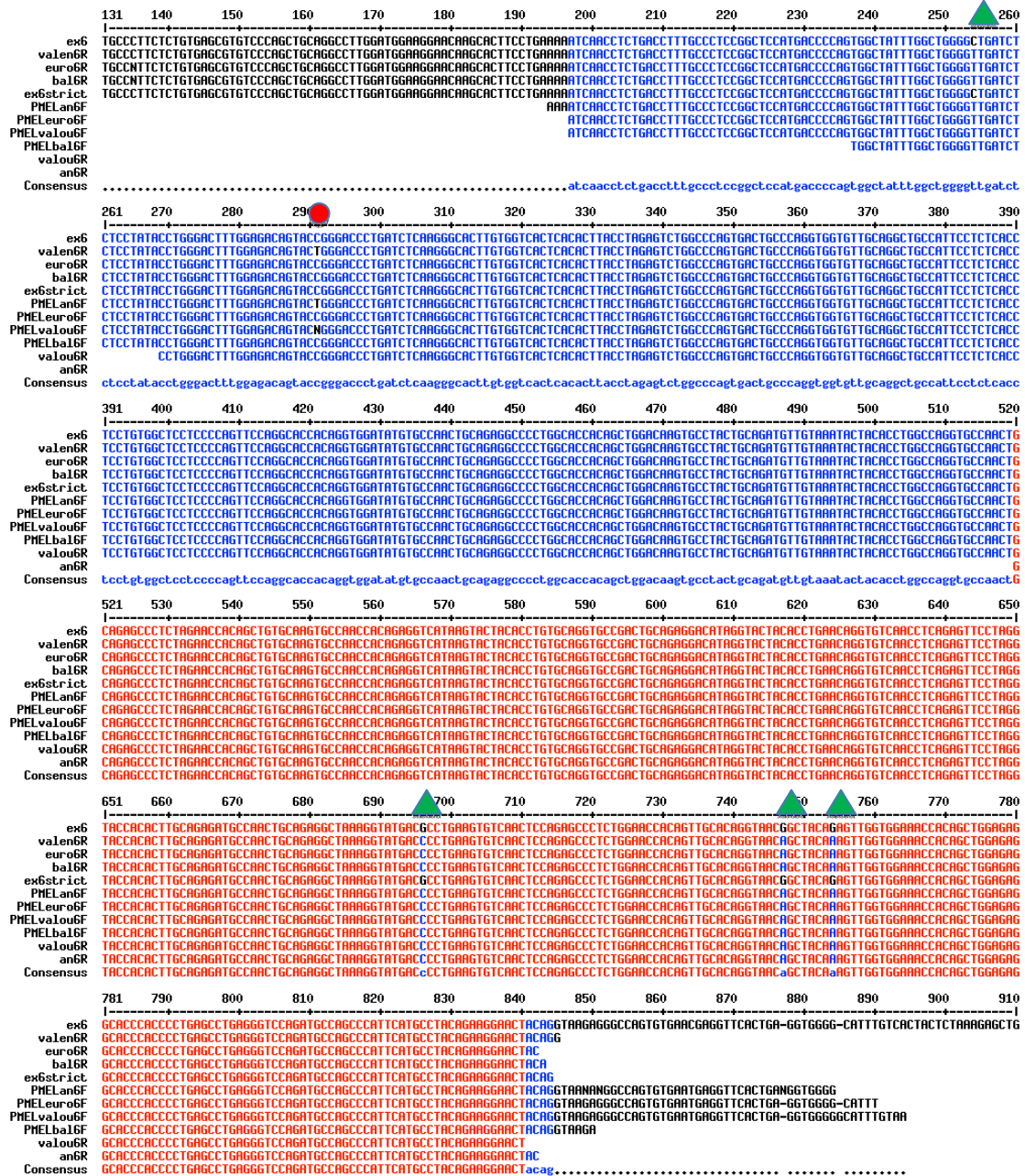
Annexe 28: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 4 et 5 entre les ânes témoins et la séquence du cheval des bases de données



Annexe 28: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 4 et 5

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 339)	SNP 2 (pos 631)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	C	A	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	C	A	1 (pos 57)	T	A
Pyrénées	Aigle Noir	C/T	G/A	2 (pos 89)	G	C
Pyrénées	Altesse	C	A	3 (pos 508)	T	C
Provence	Valence	T	G			
Provence	Valouse	C/T	G/A			
Cheval	Ensembl	C	A			

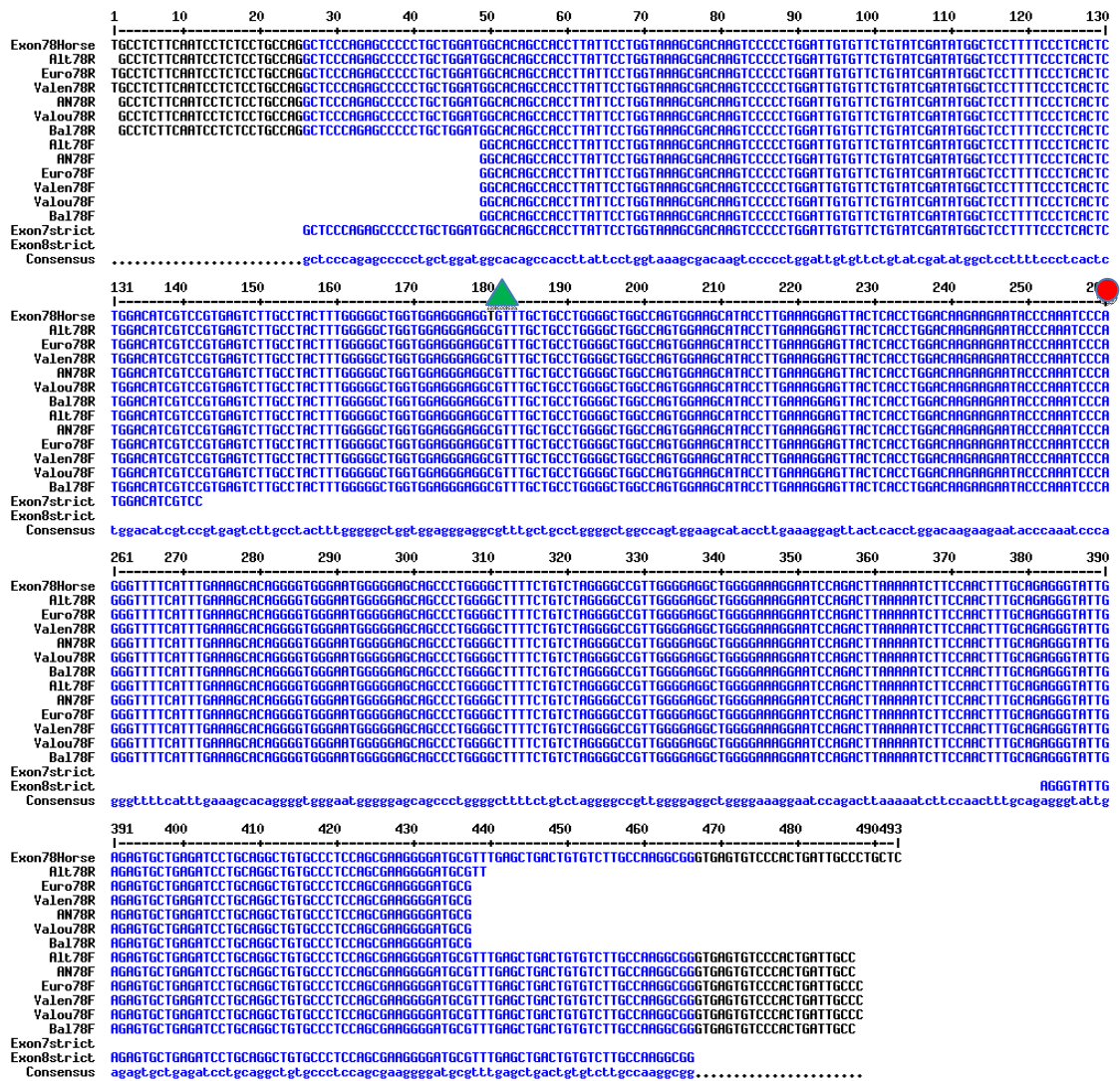
Annexe 29 : Alignement de séquences pour *PMEL* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 29 : Alignement de séquences pour *PMEL* exon 6

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 291)	SNP Cheval/Âne		
			Position	Cheval	Ânes
Normand	Balthazar	C		C	T
Normand	Euro	C	1 (pos 254)	C	T
Pyrénées	Aigle Noir	C/T	2 (pos 696)	G	C
Provence	Valence	T	3 (pos 747)	G	A
Provence	Valouse	C/T	4 (pos 754)	G	A
Cheval	Ensembl	C			

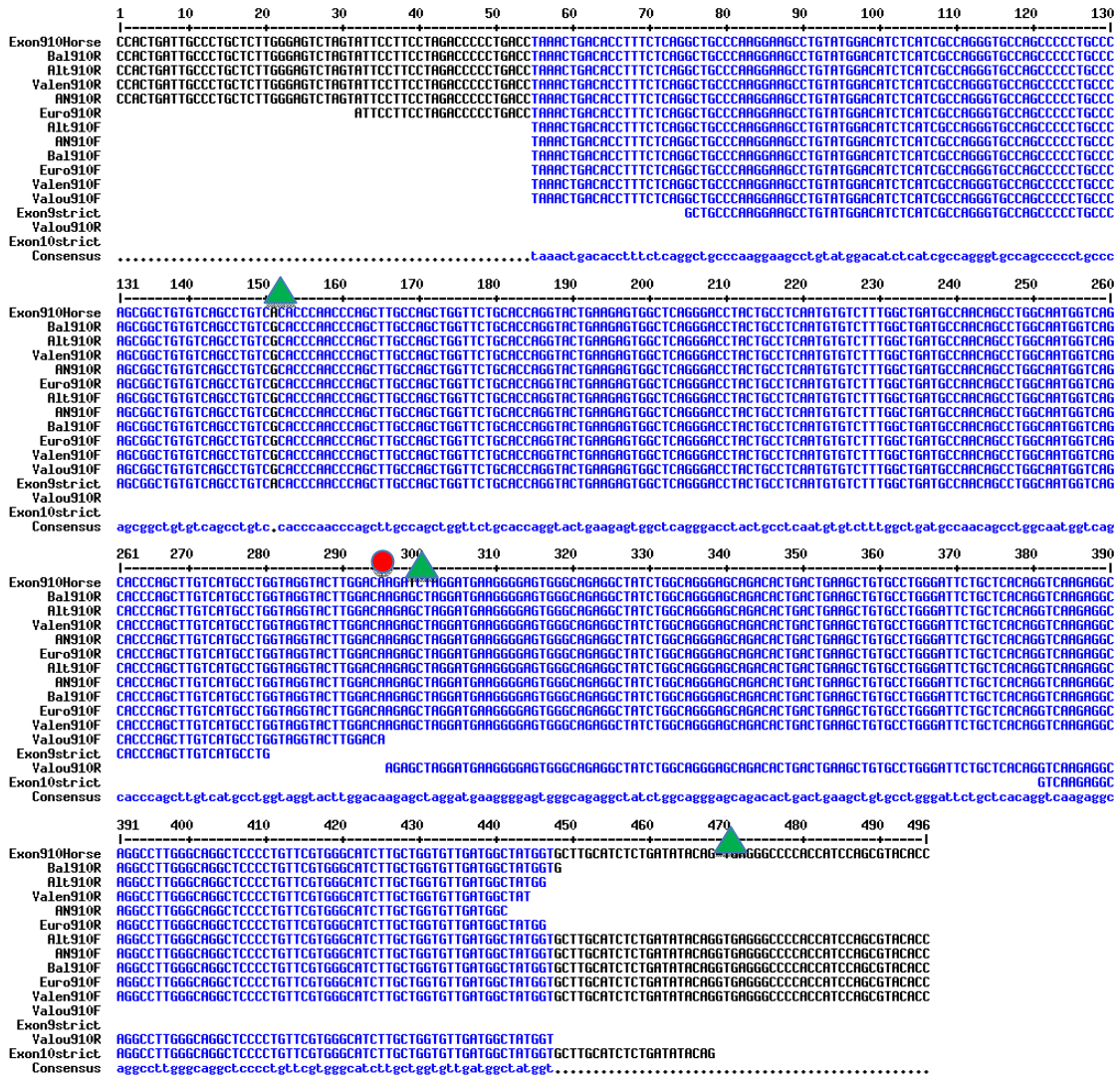
Annexe 30: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 7 et 8 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 30: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 7 et 8

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 259)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	C	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	C	1 (pos 180)	T	C
Pyrénées	Aigle Noir	C			
Pyrénées	Altesse	C			
Provence	Valence	C			
Provence	Valouse	C/T			
Cheval	Ensembl	C			

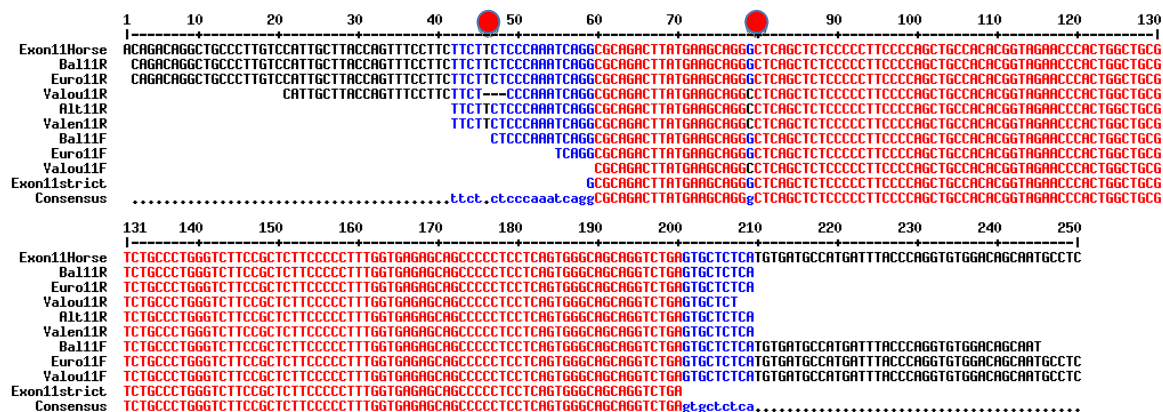
Annexe 31: Alignement de séquences pour *PMEL* exons 9 et 10 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 31: Alignement de séquences pour *PMEL* exon 9 et 10

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 295)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	A	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A	1 (pos 151)	A	G
Pyrénées	Aigle Noir	A	2 (pos 299)	T	-
Pyrénées	Altesse	A	3 (pos 469)	-	G
Provence	Valence	A			
Provence	Valouse	A/-			
Cheval	Ensembl	A			

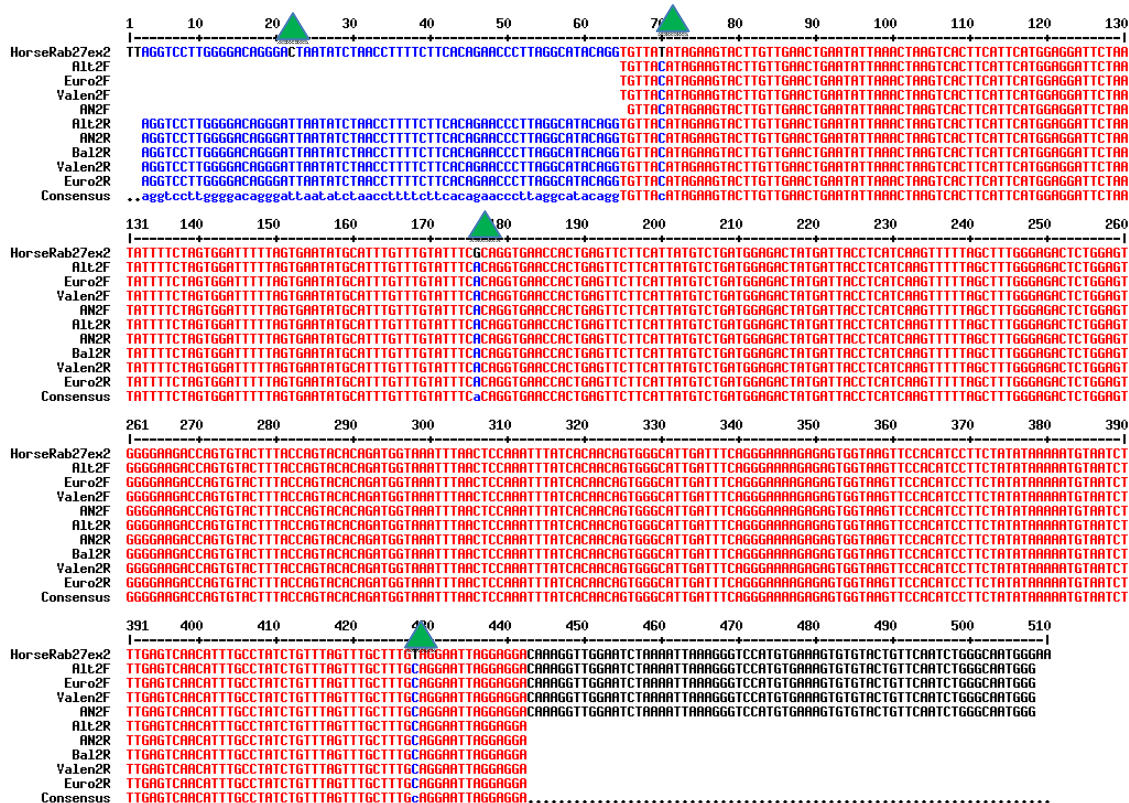
Annexe 32: Alignement de séquences pour *PMEL* exon 11 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 32 : Alignement de séquences pour *PMEL* exon 11

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 46-48)	SNP 2 (pos 79)
Normand	Balthazar	N/N	G
Normand	Euro	N/N	G
Pyrénées	Aigle Noir	N/N	C
Pyrénées	Altesse	?	?
Provence	Valence	N/Del	C
Provence	Valouse	Del/Del	C
Cheval	Ensembl	N	G

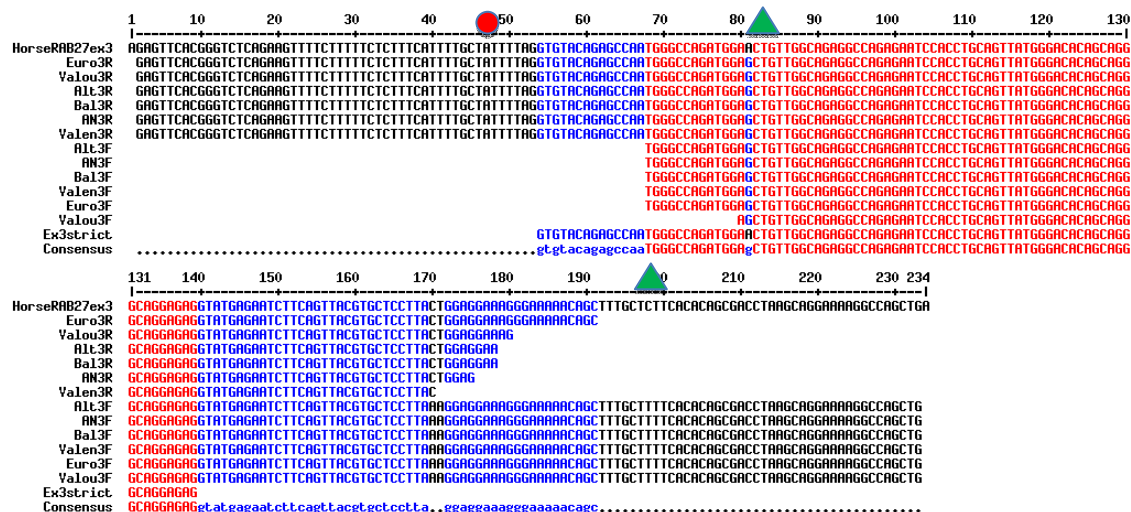
Annexe 33: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 33: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 2

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 22)	C	T
2 (pos 70)	T	C
3 (pos 176)	G	A
4 (pos 428)	T	C

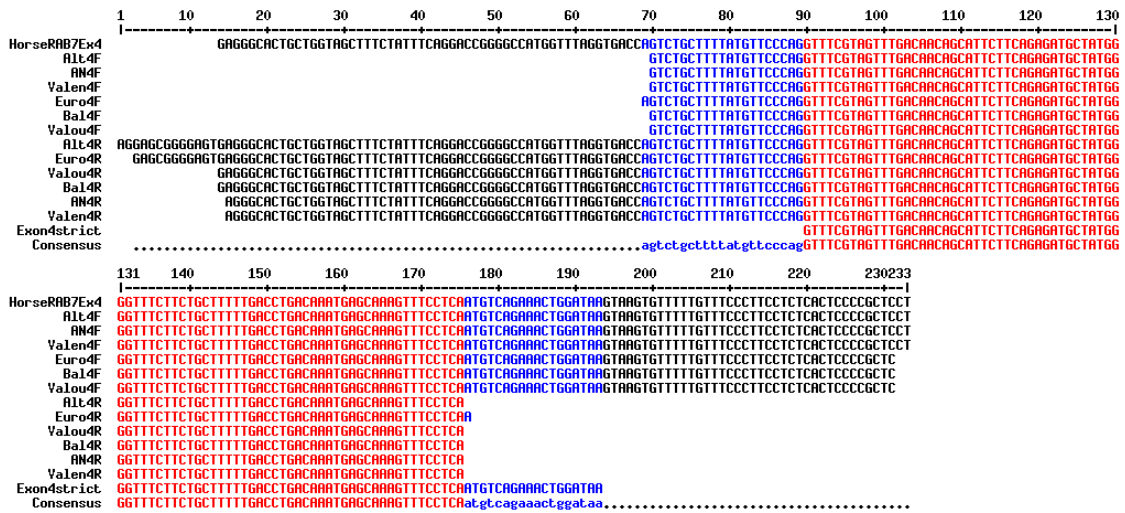
Annexe 34: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 34: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 3

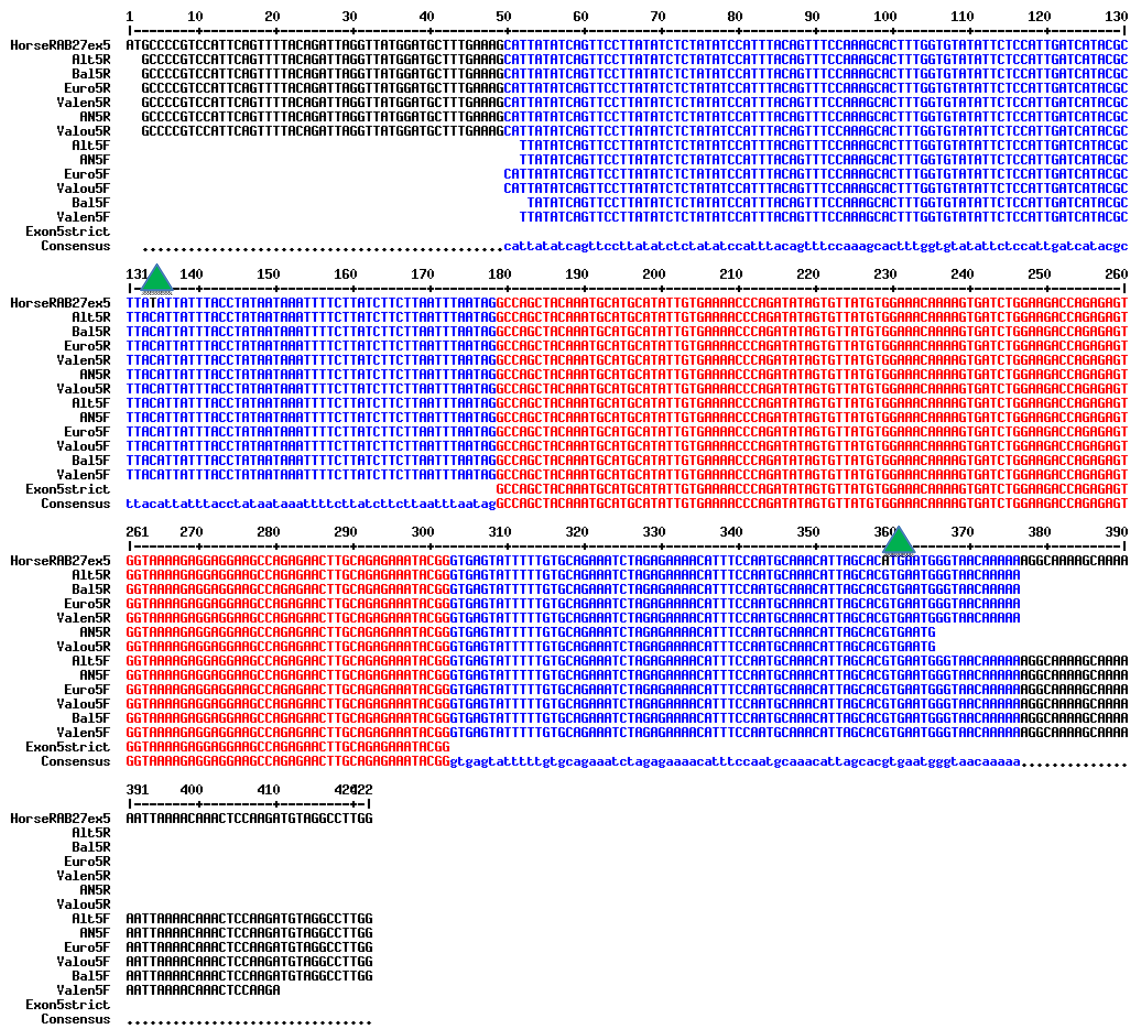
SNP entre ânes		SNP 1 (pos 46)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	A/T	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A/T	1 (pos 81)	A	G
Pyrénées	Aigle Noir	T	2 (pos 198)	C	T
Pyrénées	Altesse	A/T			
Provence	Valence	T			
Provence	Valouse	A/T			
Cheval	Ensembl	T			

Annexe 35: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 4 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 35: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 4

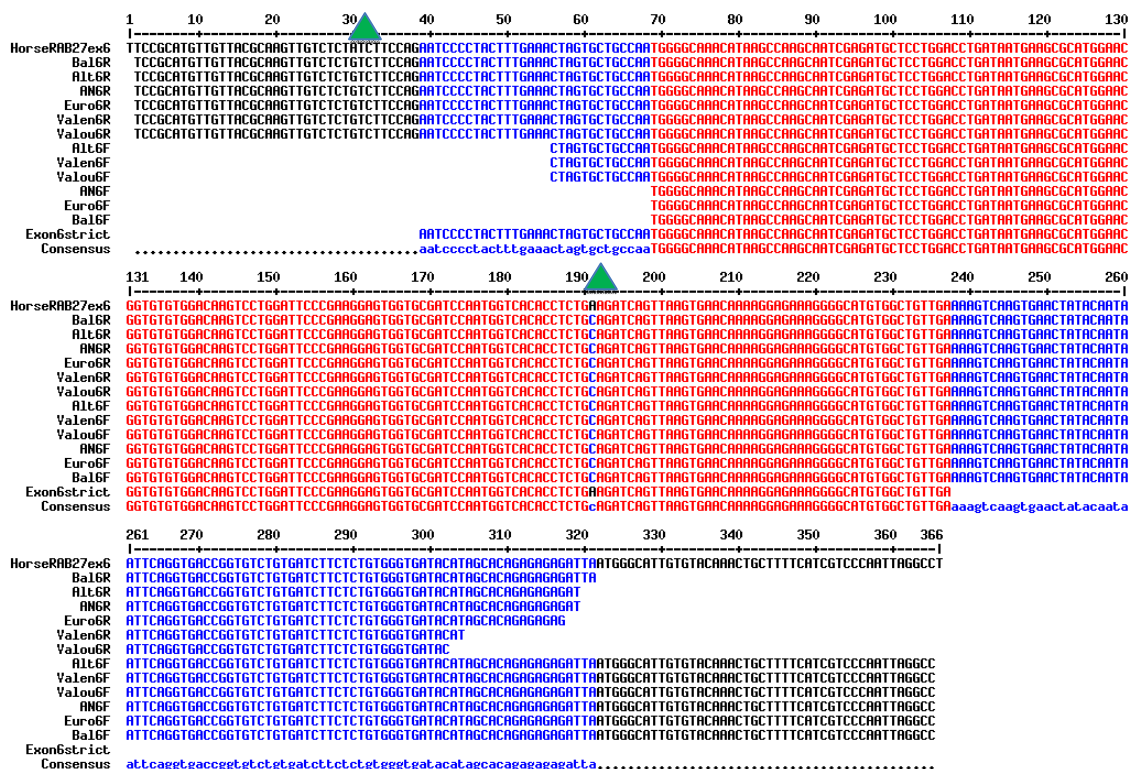
Annexe 36: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 5 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 36: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 5

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 134)	T	C
2 (pos 359)	A	G

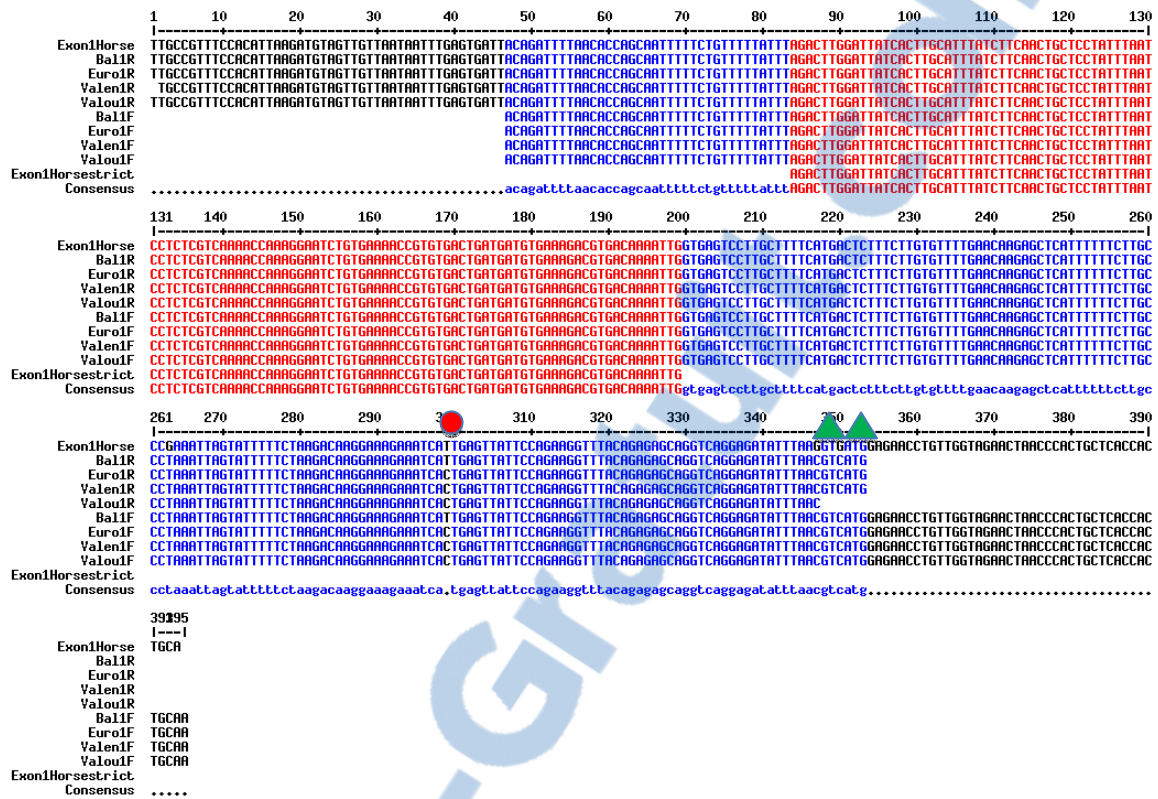
Annexe 37: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 37: Alignement de séquences pour *RAB27a* exon 6

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 30)	A	G
2 (pos 191)	A	C

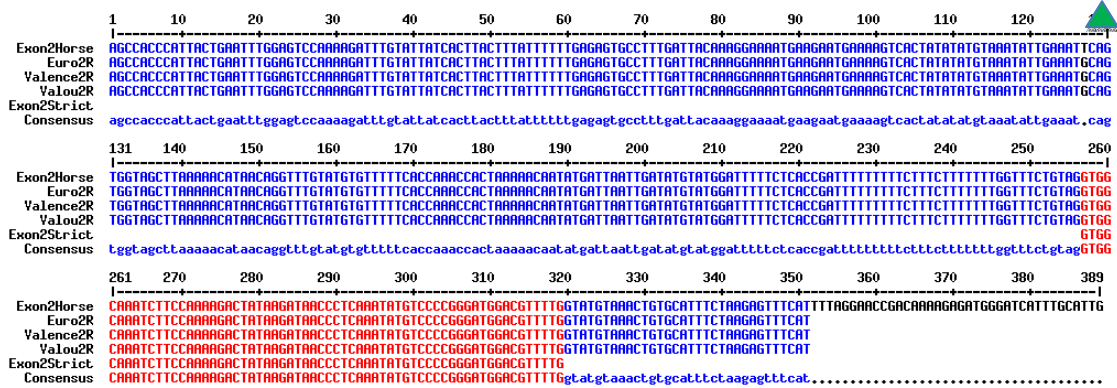
Annexe 38: Alignement de séquences pour *KITL* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 38: Alignement de séquences pour *KITL* exon 1

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 299)	SNP Cheval/Âne		
			Position	Cheval	Ânes
Normand	Balthazar	C/T	1 (pos 347)	G	C
Normand	Euro	C	2 (pos 350)	G	C
Provence	Valence	C			
Provence	Valouse	C			
Cheval	Ensembl	T			

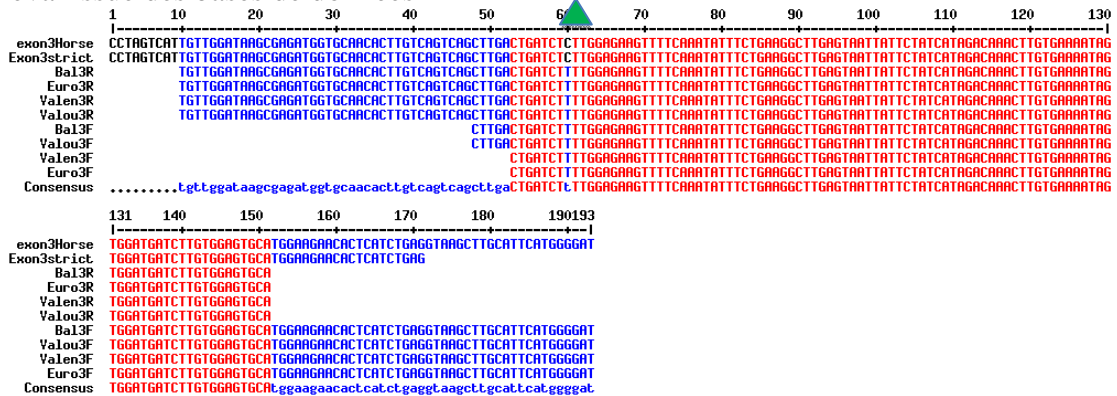
Annexe 39: Alignement de séquences pour *KITL* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 39: Alignement de séquences pour *KITL* exon 2

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 127)	T	G

Annexe 40: Alignement de séquences pour *KITL* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données

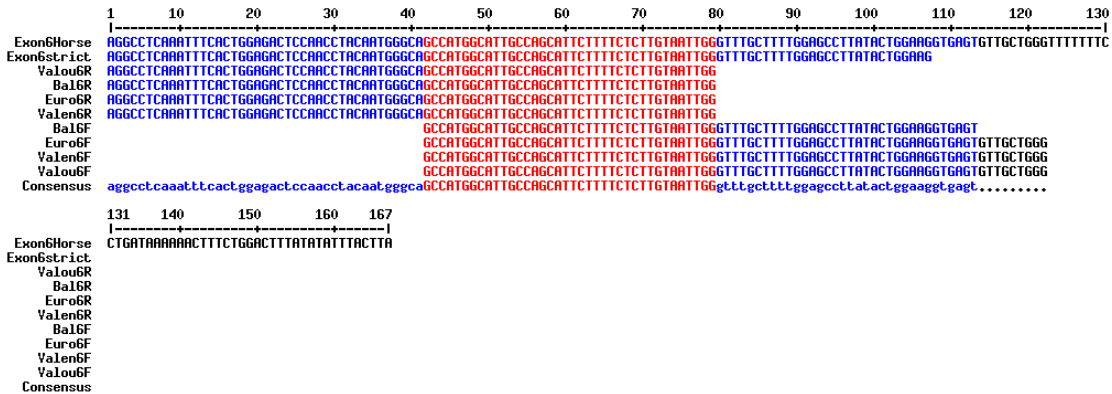


Annexe 40: Alignement de séquences pour *KITL* exon 3

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 60)	C	T

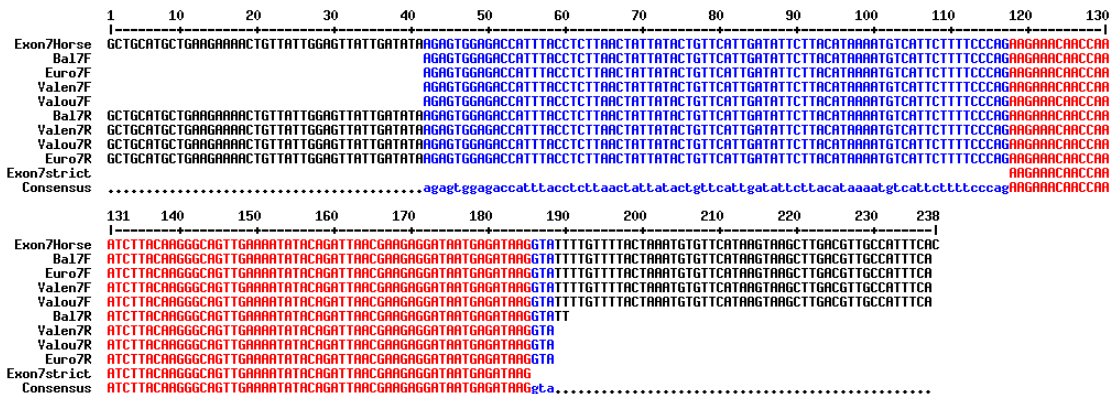


Annexe 43: Alignement de séquences pour *KITL* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



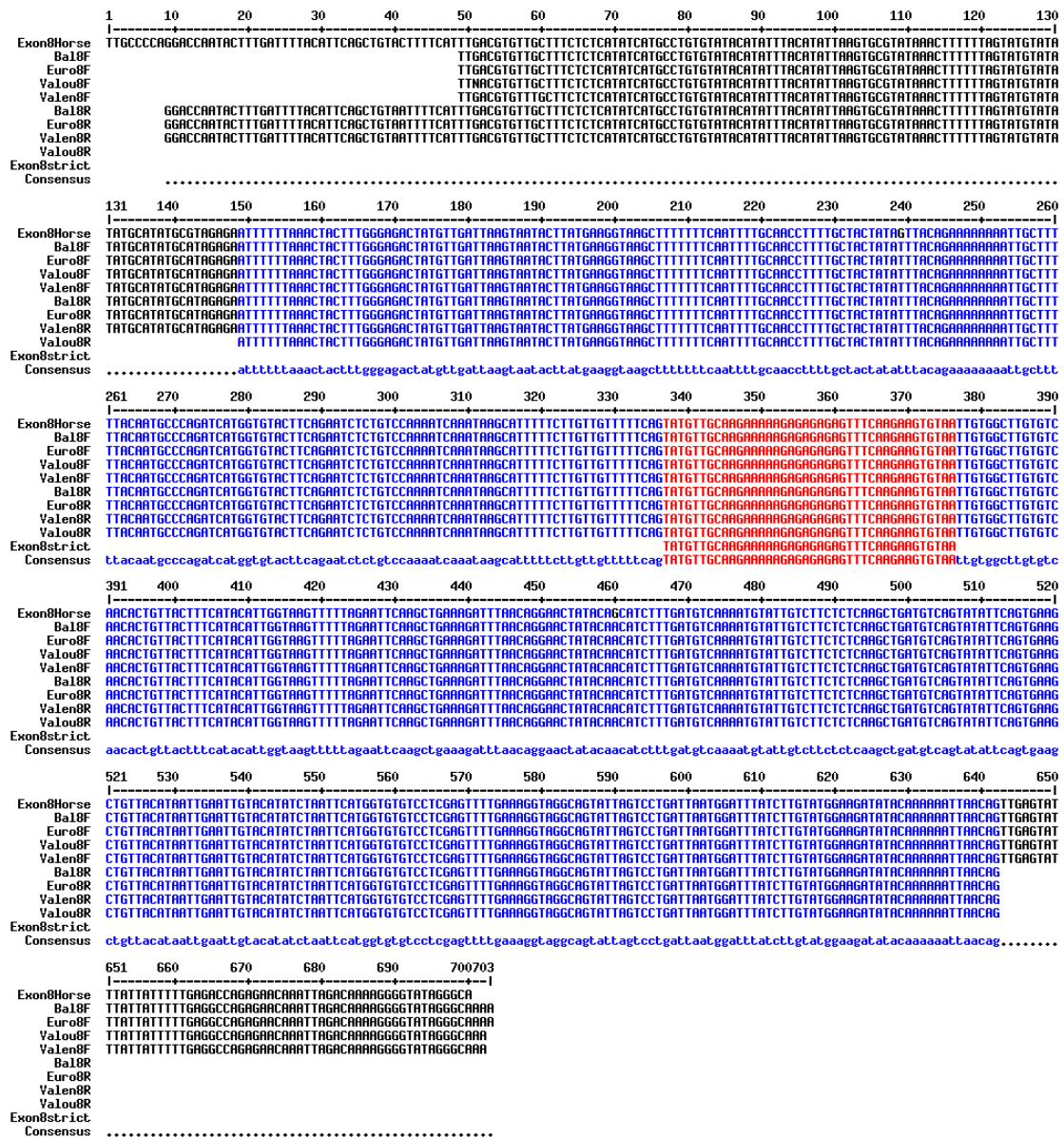
Annexe 43: Alignement de séquences pour *KITL* exon 6

Annexe 44: Alignement de séquences pour *KITL* exon 7 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



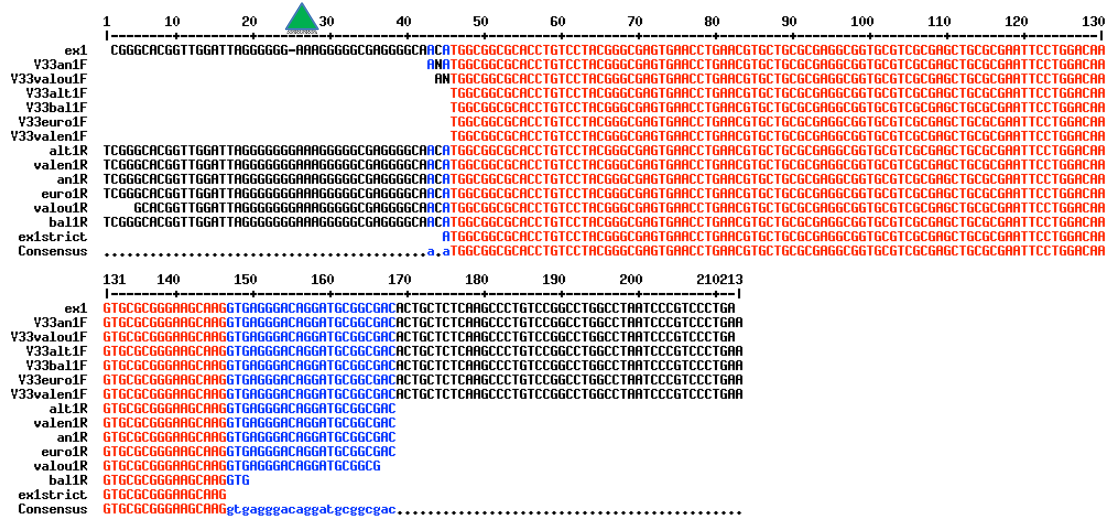
Annexe 44: Alignement de séquences pour *KITL* exon 7

Annexe 45: Alignement de séquences pour *KITL* exon 8 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 45: Alignement de séquences pour *KITL* exon 8

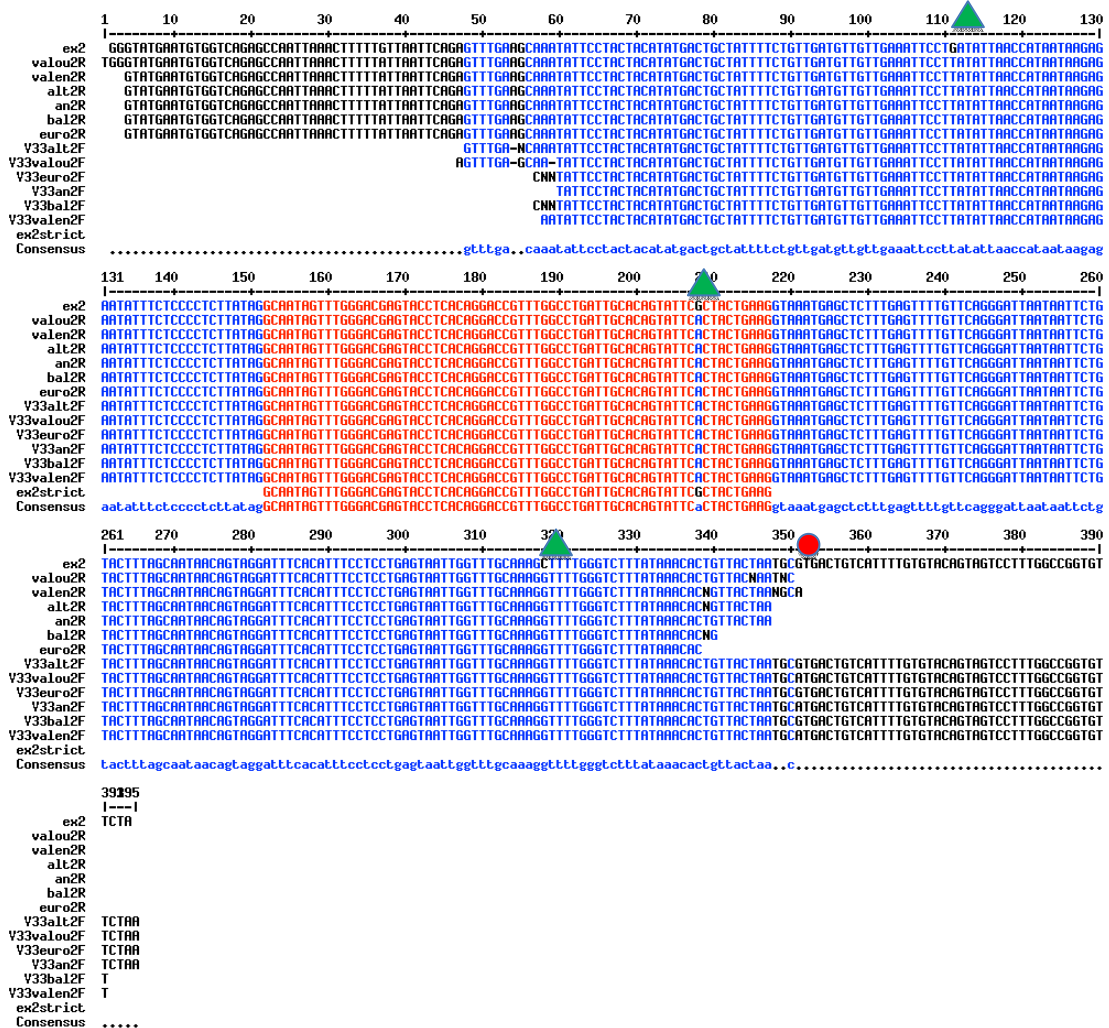
Annexe 46: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 46: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 1

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 26)	-	G

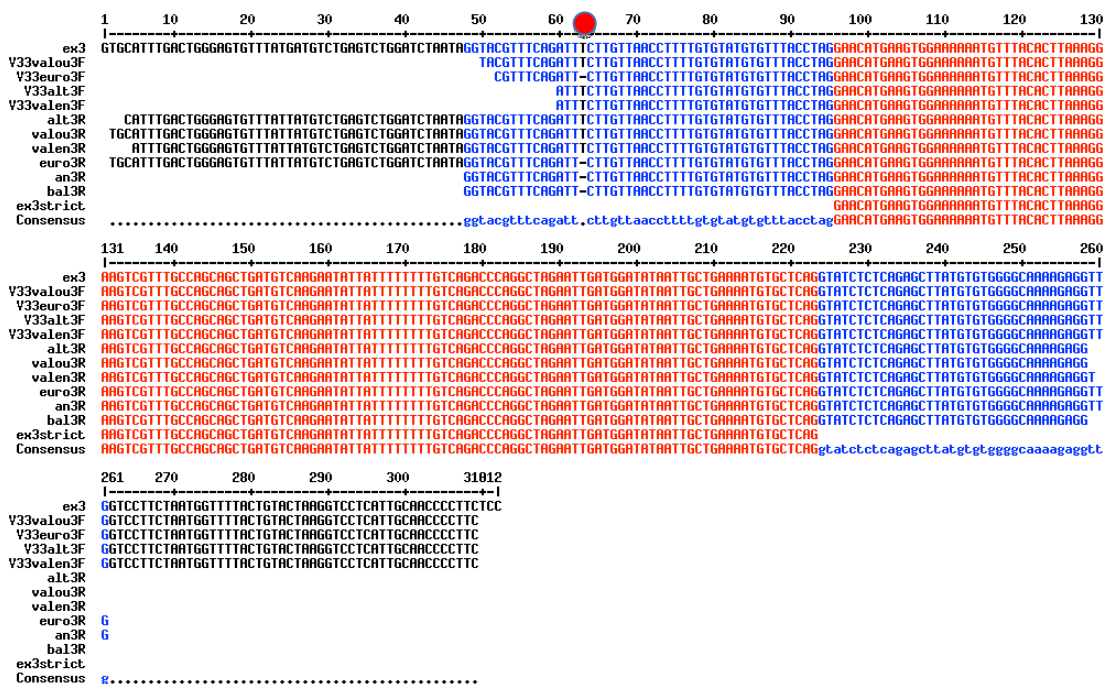
Annexe 47: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 47: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 2

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 351)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	G	1 (pos 111)	G	T
Pyrénées	Aigle Noir	A/G	2 (pos 208)	G	A
Pyrénées	Altesse	G	3 (pos 318)	C	G
Provence	Valence	A			
Provence	Valouse	A/G			
Cheval	Ensembl	G			

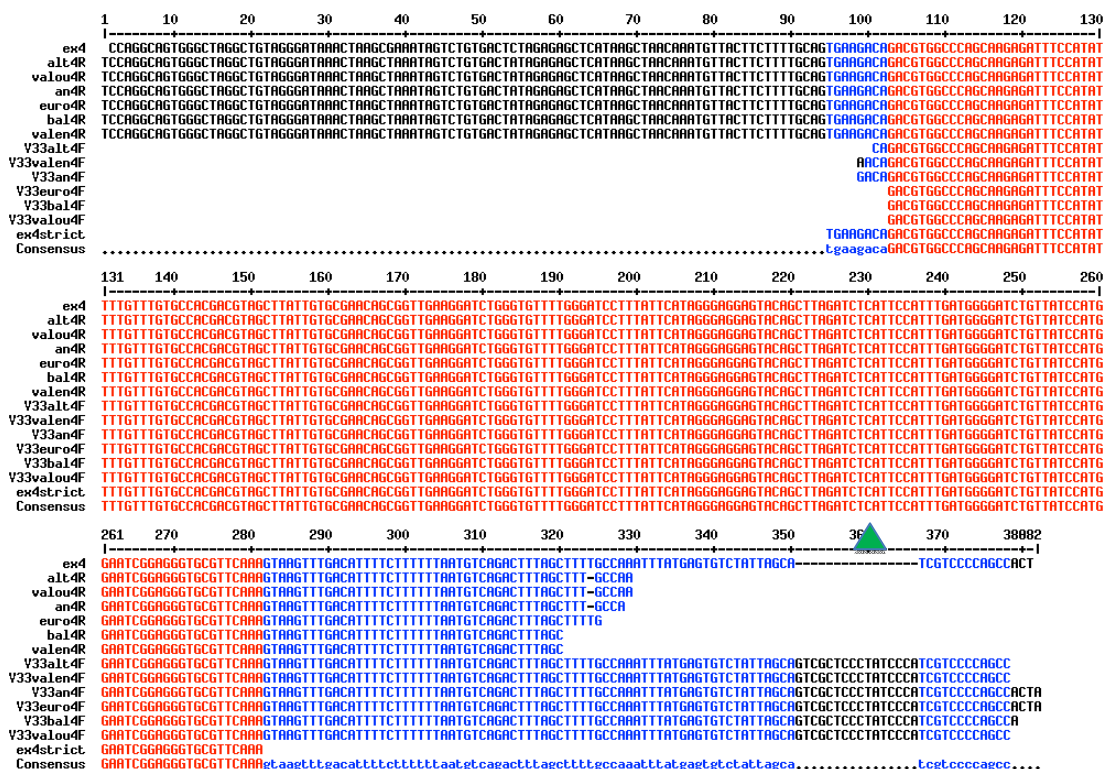
Annexe 48: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 48: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 3

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 63)
Normand	Balthazar	T/Del
Normand	Euro	Del/Del
Pyrénées	Aigle Noir	T/Del
Pyrénées	Altesse	T/T
Provence	Valence	T/T
Provence	Valouse	T/T
Cheval	Ensembl	T

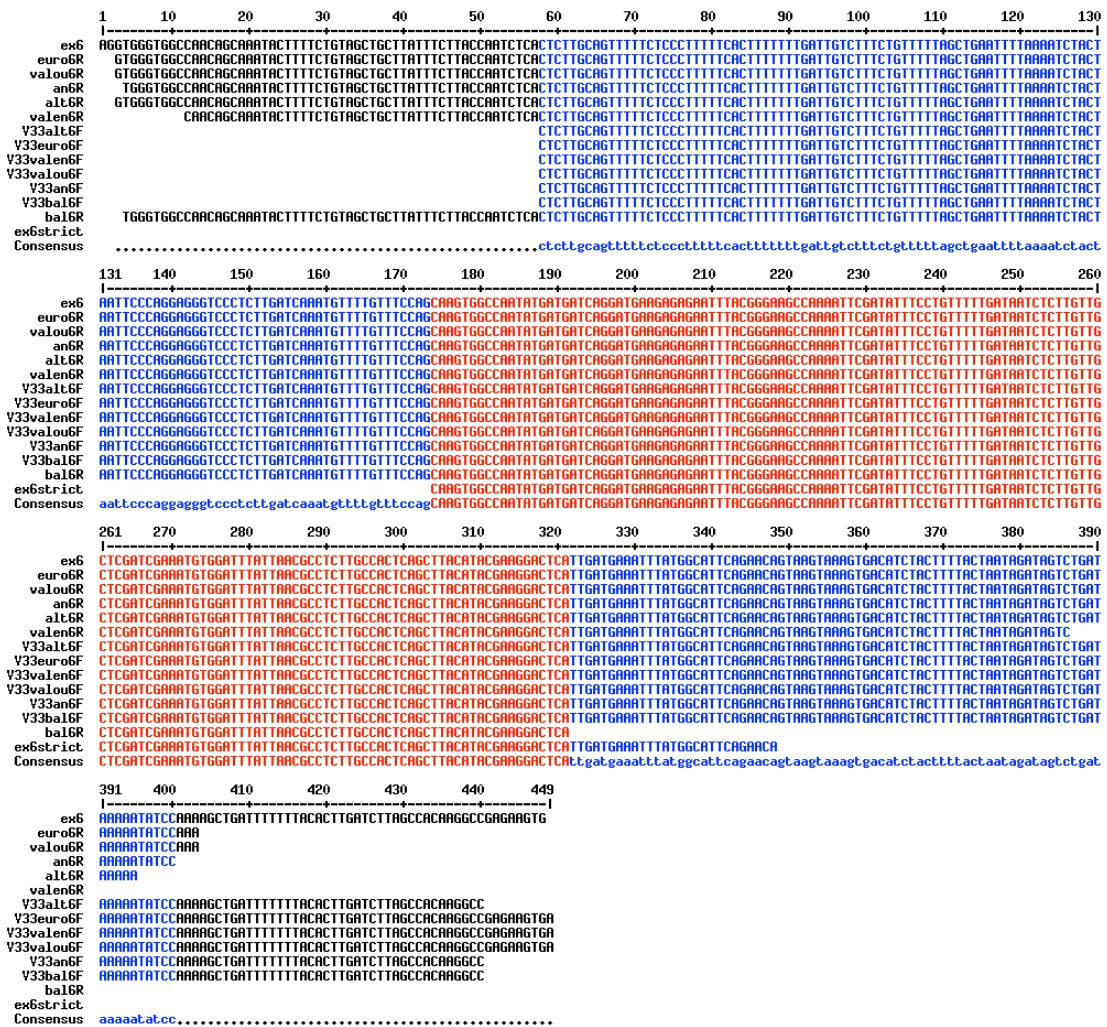
Annexe 49: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 4 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 49: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 4

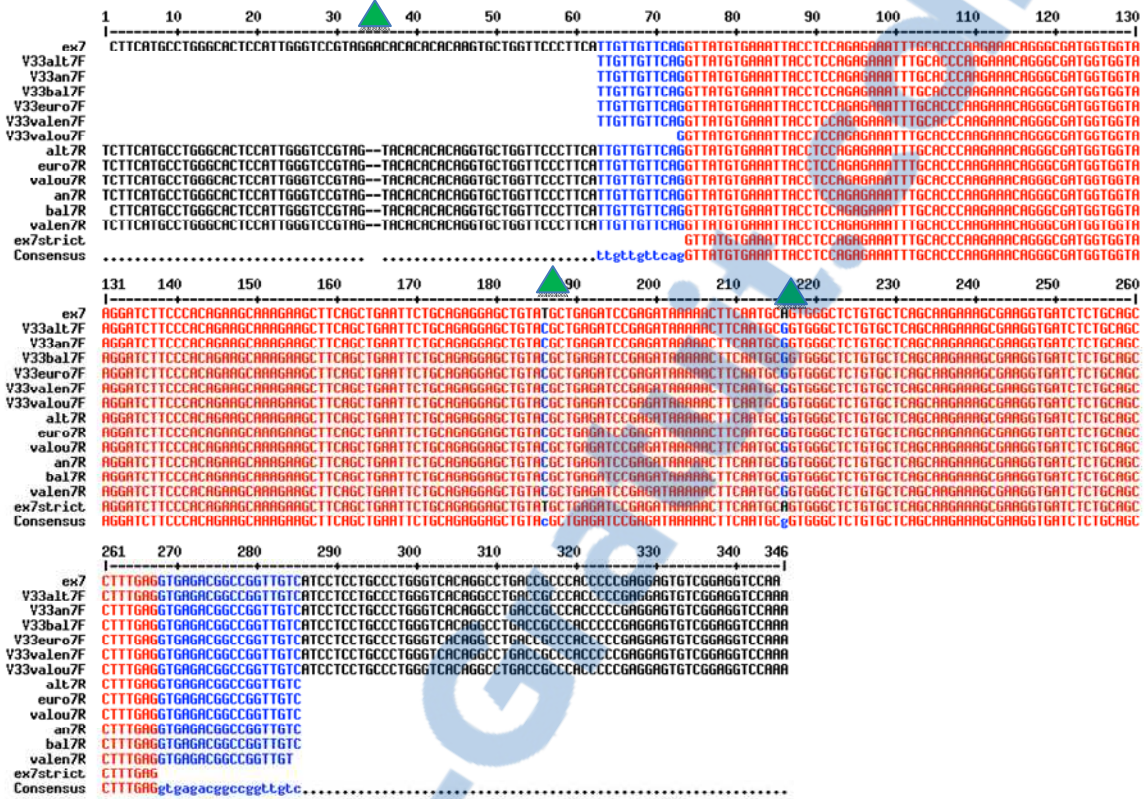
SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 26)	-	GTCGCTCCCTATCCCA

Annexe 50 : Aligement de séquences pour *VPS33a* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 50: Aligement de séquences pour *VPS33a* exon 6

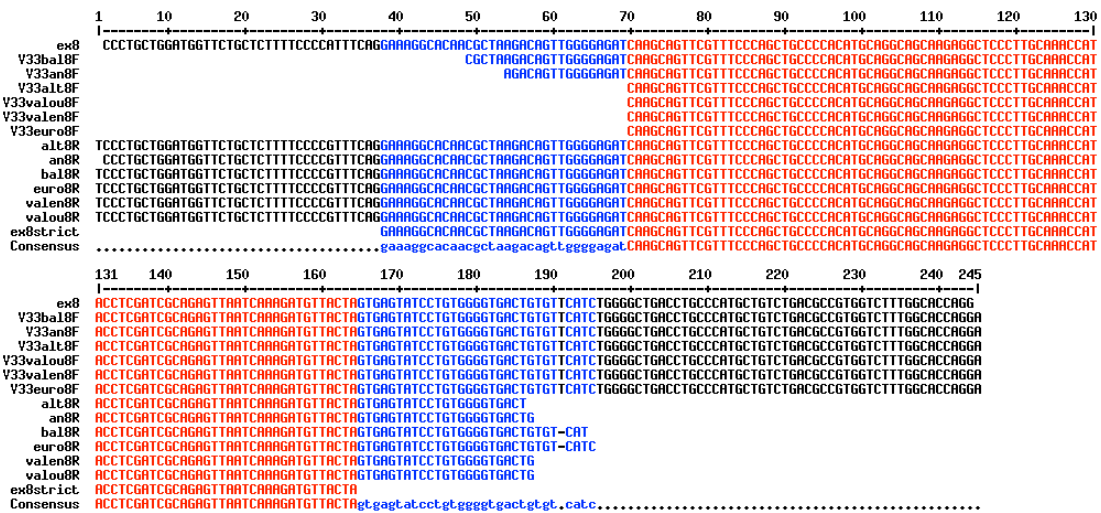
Annexe 51: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 7 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 51: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 7

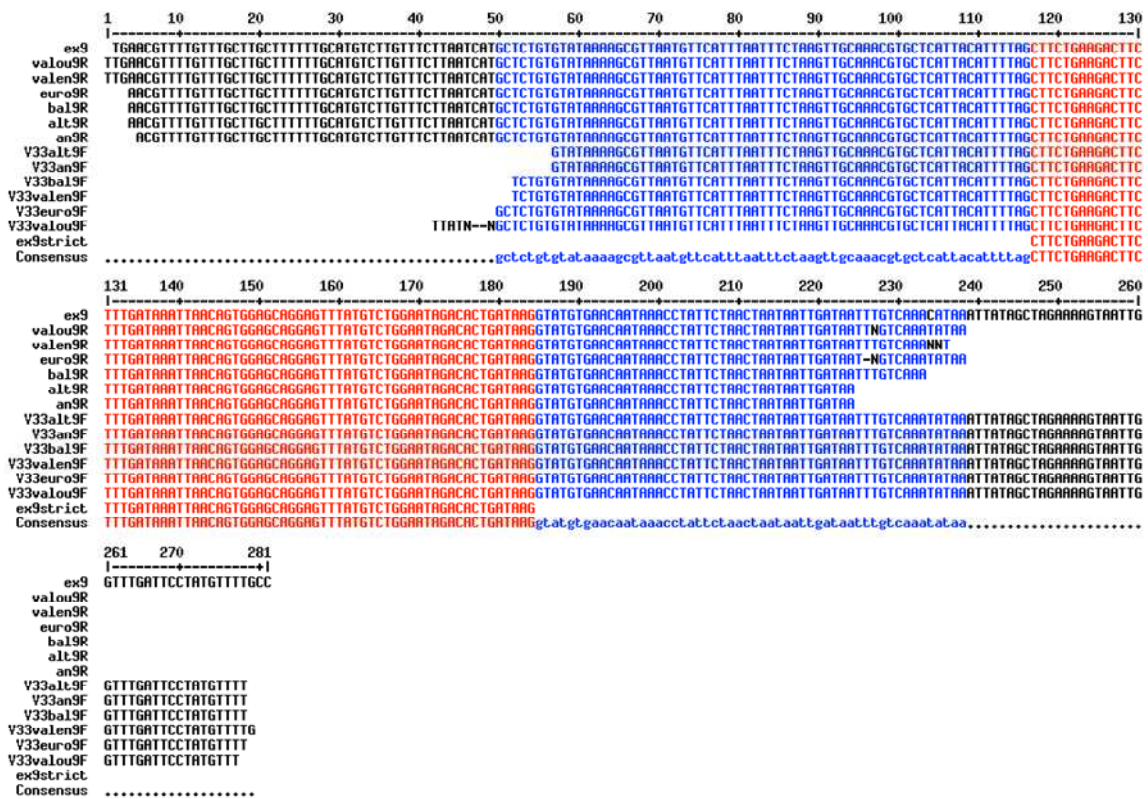
SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 403)	T	C
2 (pos 186)	A	G
3 (pos 34-36)	GAC	--T

Annexe 52: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 8 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



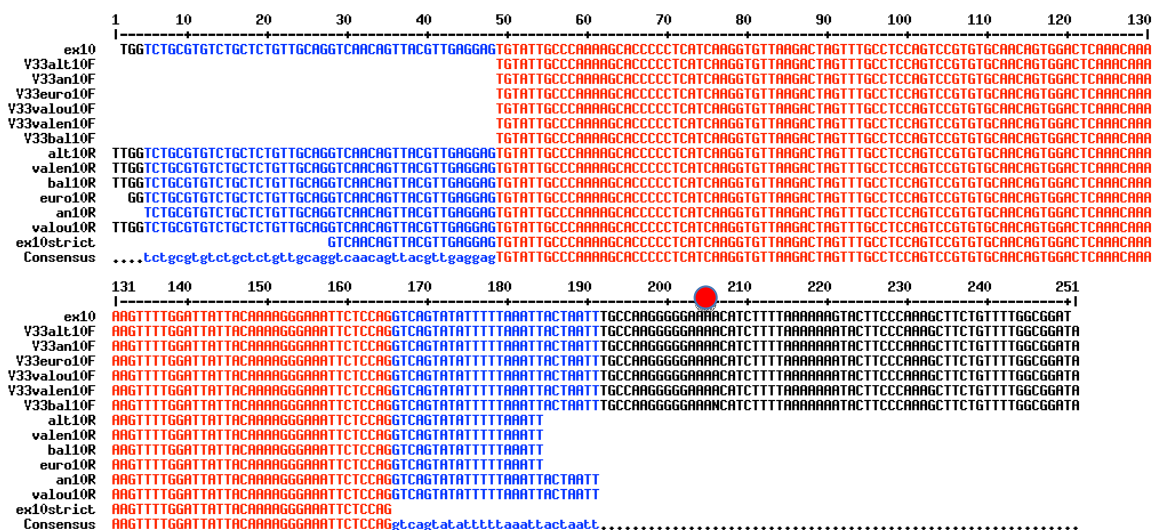
Annexe 52: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 8

Annexe 53 : Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 8 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 53: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 9

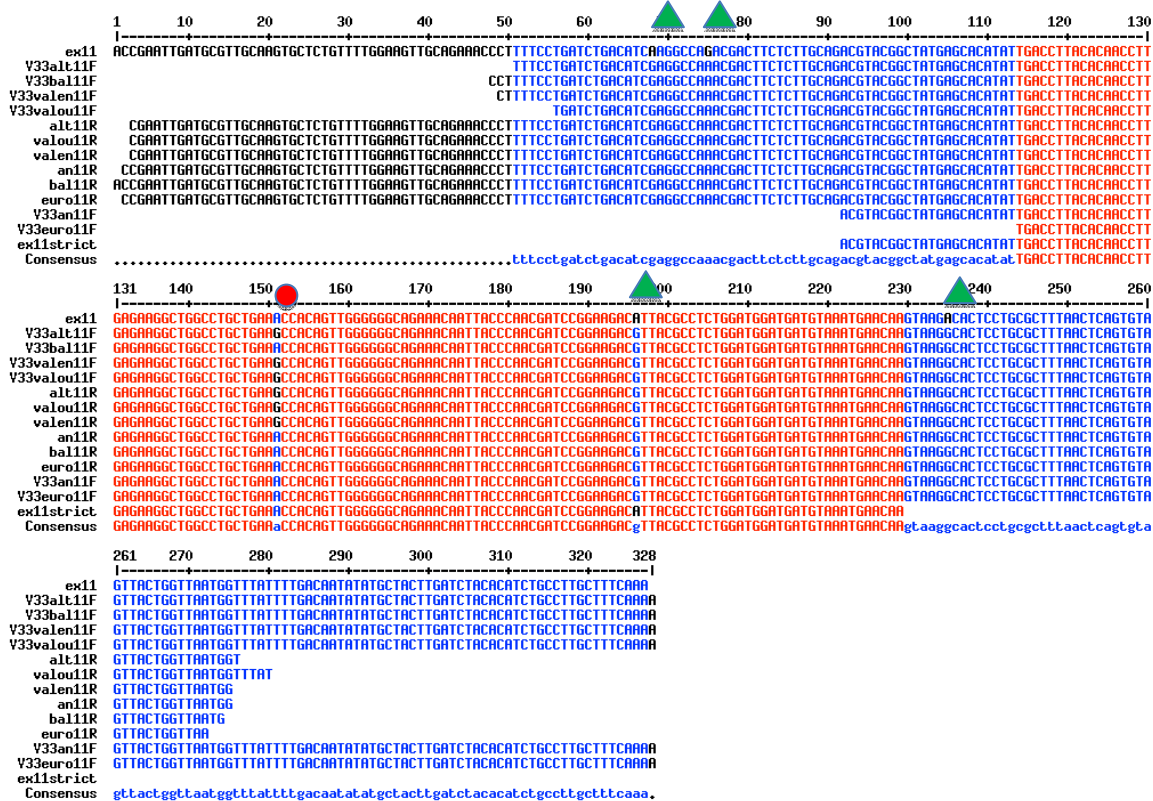
Annexe 54: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 10 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 54: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 10

SNP entre ânes 		SNP 1 (pos 206)
Normand	Balthazar	A/G
Normand	Euro	A
Pyrénées	Aigle Noir	A
Pyrénées	Altesse	A
Provence	Valence	A
Provence	Valouse	A
Cheval	Ensembl	A

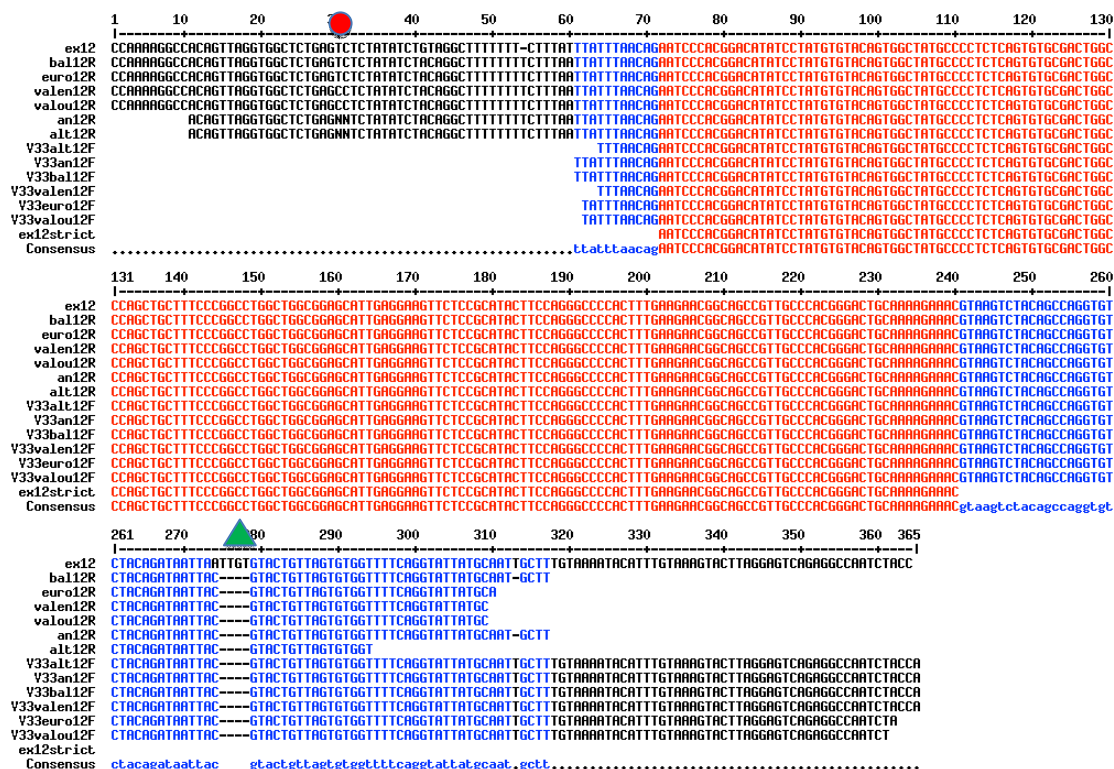
Annexe 55: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 11 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 55: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 11

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 151)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	A/G	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A/G	1 (pos 68)	A	G
Pyrénées	Aigle Noir	A/G	2 (pos 75)	G	A
Pyrénées	Altesse	G	3 (pos 196)	A	G
Provence	Valence	G	4 (pos 235)	A	G
Provence	Valouse	G			
Cheval	Ensembl	A			

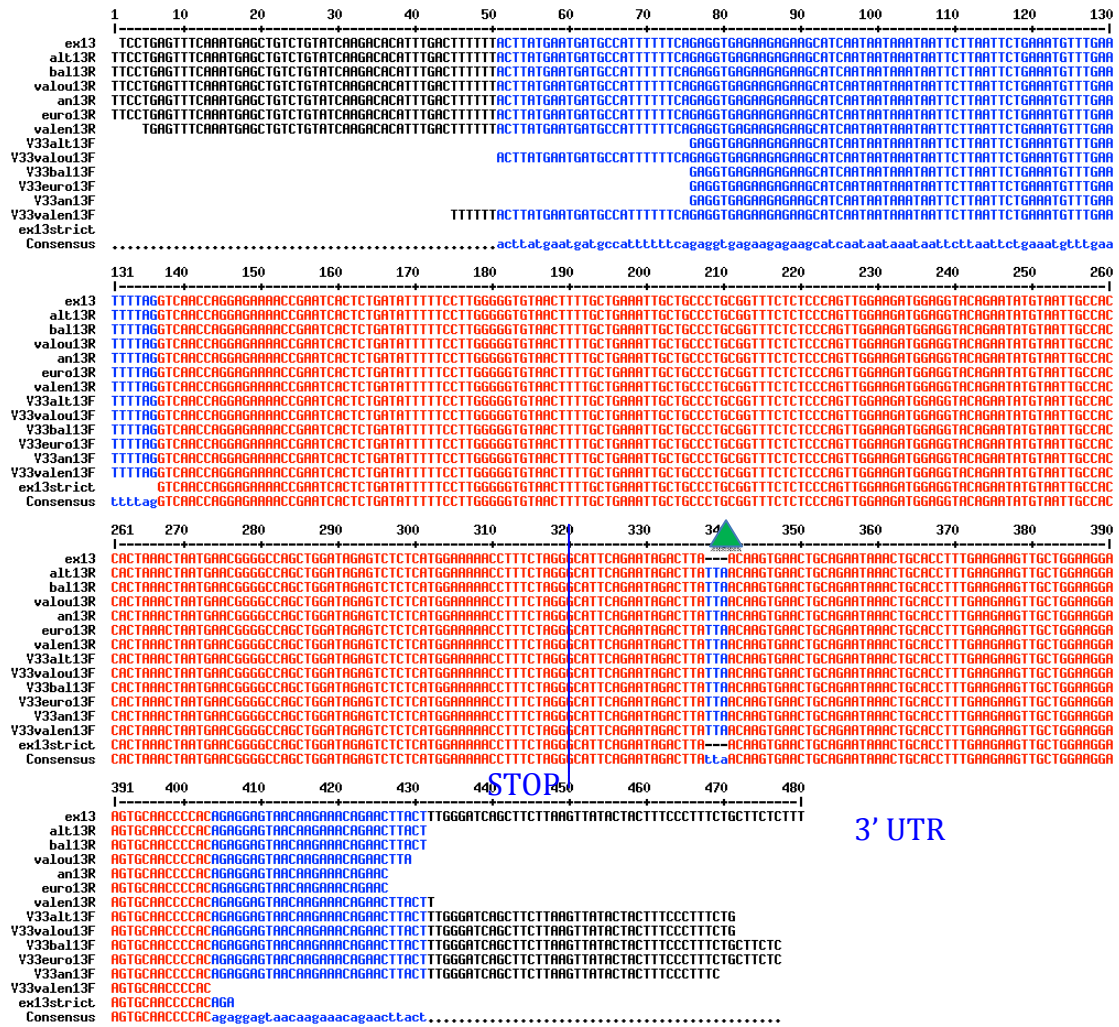
Annexe 56: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 12 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 56: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 12

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 30)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	T	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	T	1 (pos 274-278)	ATTGT	----
Pyrénées	Aigle Noir	T/C			
Pyrénées	Altesse	T/C			
Provence	Valence	C			
Provence	Valouse	C			
Cheval	Ensembl	T			

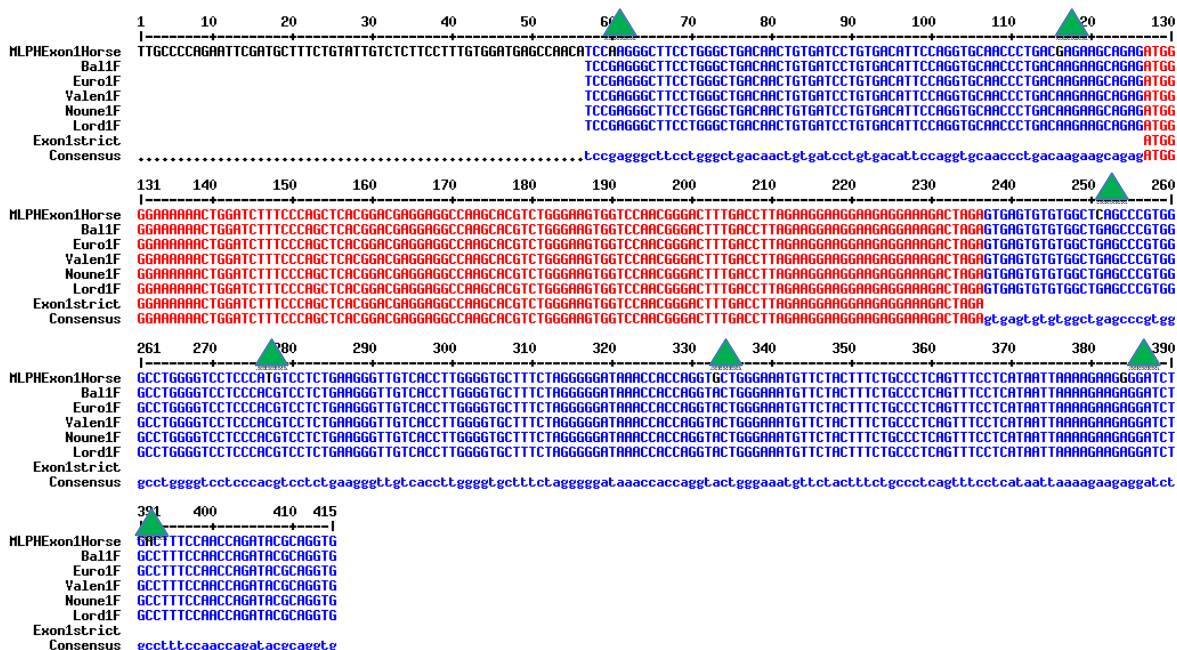
Annexe 57: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 13 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 57: Alignement de séquences pour *VPS33a* exon 13

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 338-340)	---	TTA

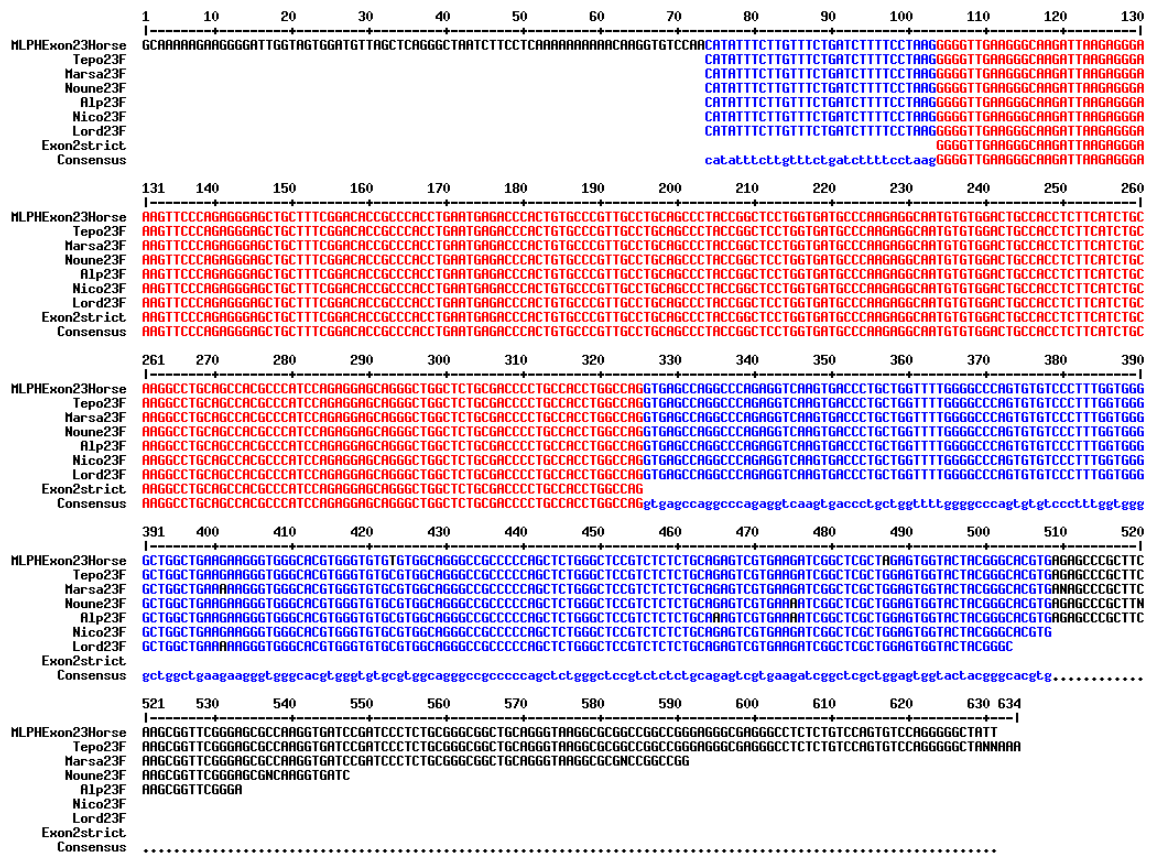
Annexe 58: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 58: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 1

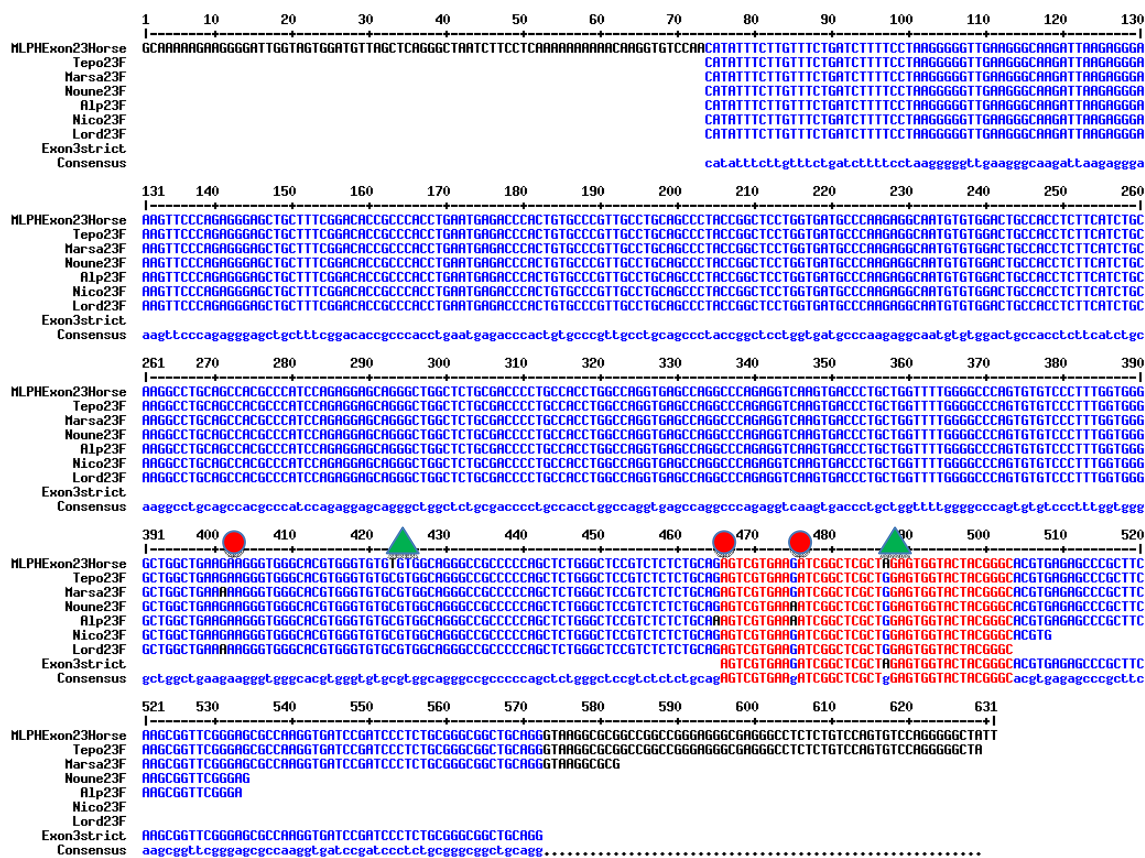
SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 60)	A	G
2 (pos 116)	G	A
3 (pos 251)	C	G
4 (pos 277)	T	C
5 (pos 333)	G	A
6 (pos 384)	G	A
7 (pos 392)	A	C

Annexe 59: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 59: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 2

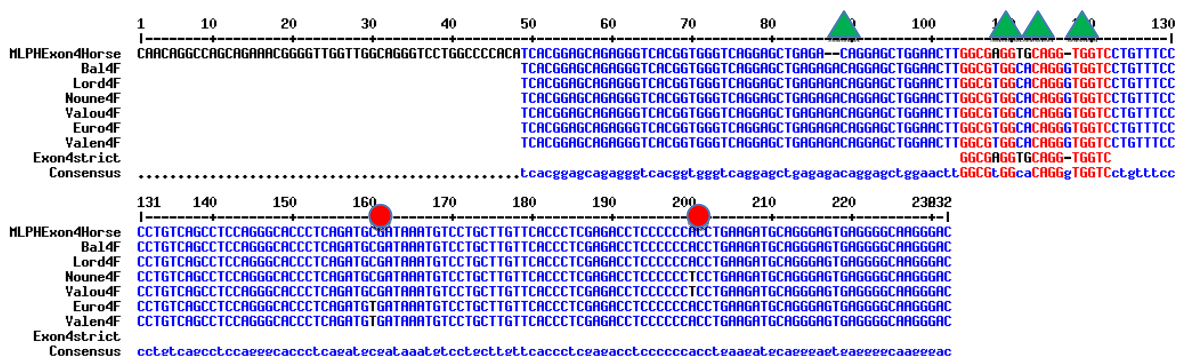
Annexe 60 : Alignement de séquences pour *MLPH* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 60: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 3

SNP entre ânes		SNP 1 (401)	SNP 2 (465)	SNP 3 (475)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Marsavril	A	G	A/G	Position	Cheval	Ânes
Normand	Nico	G	G	A/G	1 (423)	T	C
Grand Noir du Berry	Noune	G	G	A/G	2 (487)	A	G
Grand Noir du Berry	Lord	A	G	G			
Provence	Alpille	G	A	A/G			
Provence	Tepo	G	G	G			
Cheval	Ensembl	G	G	G			

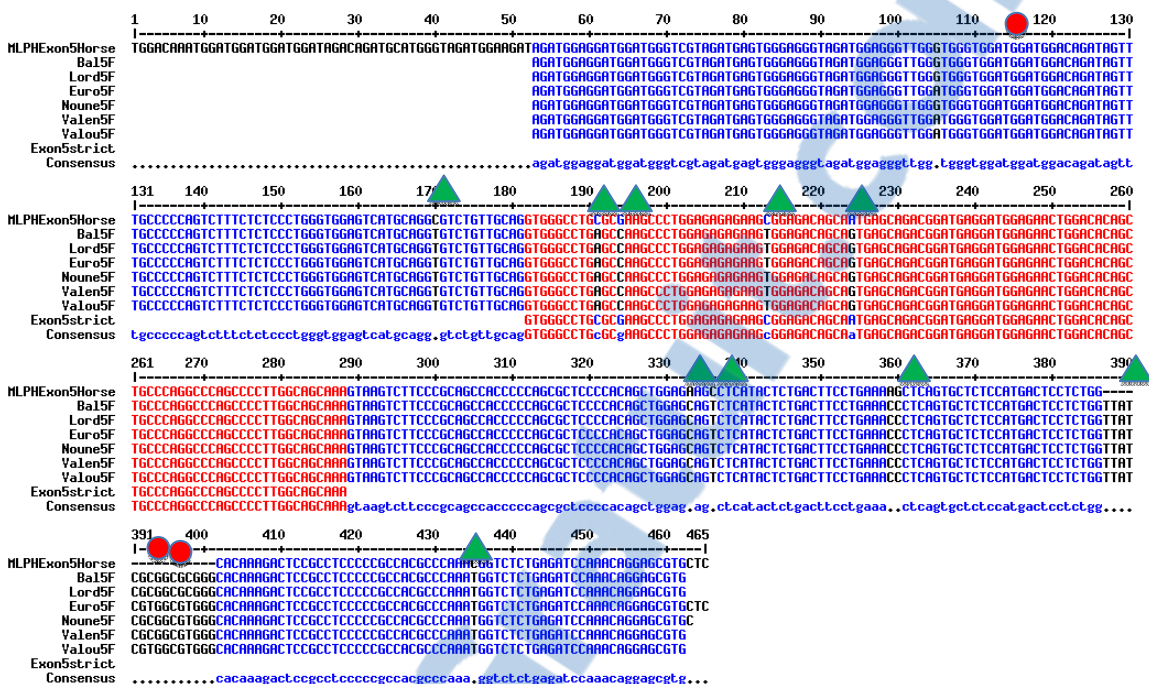
Annexe 61 : Alignement de séquences pour *MLPH* exon 4 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 61: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 4

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 160)	SNP 2 (pos 200)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	C	A	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	C/T	A	1 (pos 87-88)	--	GA
Grand Noir du Berry	Noune	C	T	2 (pos 108)	A	T
Grand Noir du Berry	Lord	C	A/T	3 (pos 111-112)	TG	CA
Provence	Valence	C /T	A	4 (pos 117)	-	G
Provence	Valouse	C	A/T			
Cheval	Ensembl	C	A			

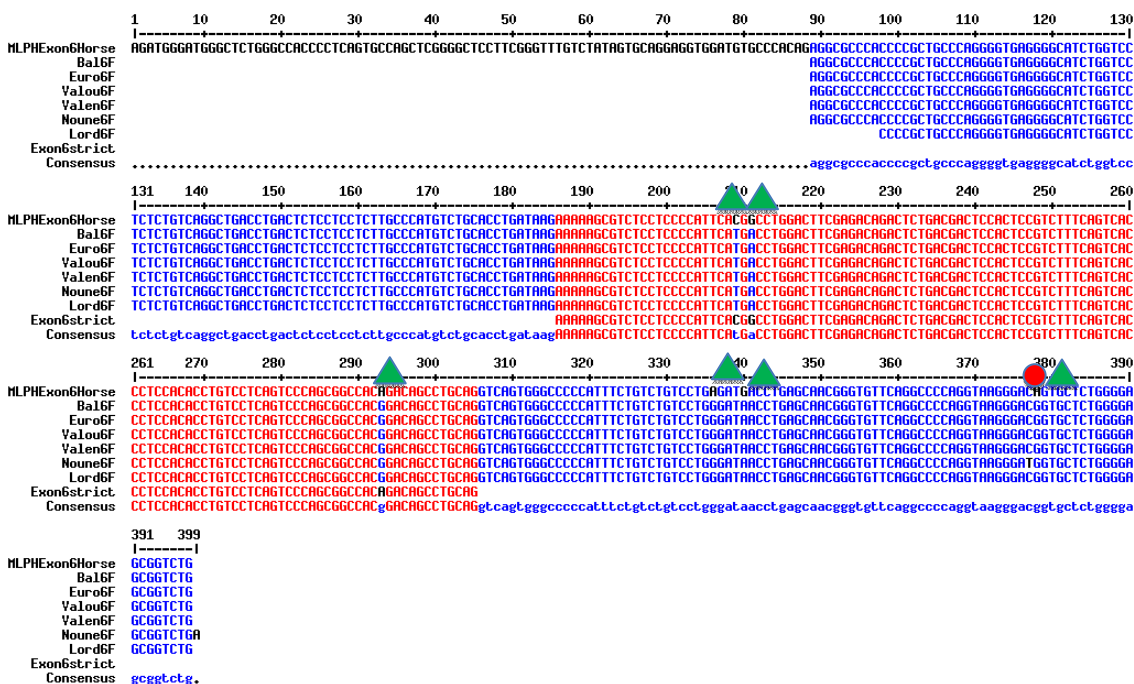
Annexe 62 : Alignement de séquences pour *MLPH* exon 5 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 62: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 5

SNP entre ânes		SNP 1 (115)	SNP 2 (393)	SNP 3 (398)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G	C	C/T	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A/G	C/T	T	1 (170)	C	T
Grand Noir du Berry	Noune	G	C	T	2 (191)	C	A
Grand Noir du Berry	Lord	G	C	C/T	3 (194)	G	C
Provence	Valence	A/G	C/T	T	4 (213)	C	T
Provence	Valouse	A/G	C/T	T	5 (224)	A	G
Cheval	Ensembl	G	C	T	6 (333)	A	C
					7 (336)	C	T
					8 (359-360)	AG	CC
					9 (435)	C	T
					10 (387-401)	-	TTATCGC GGCGCG GG

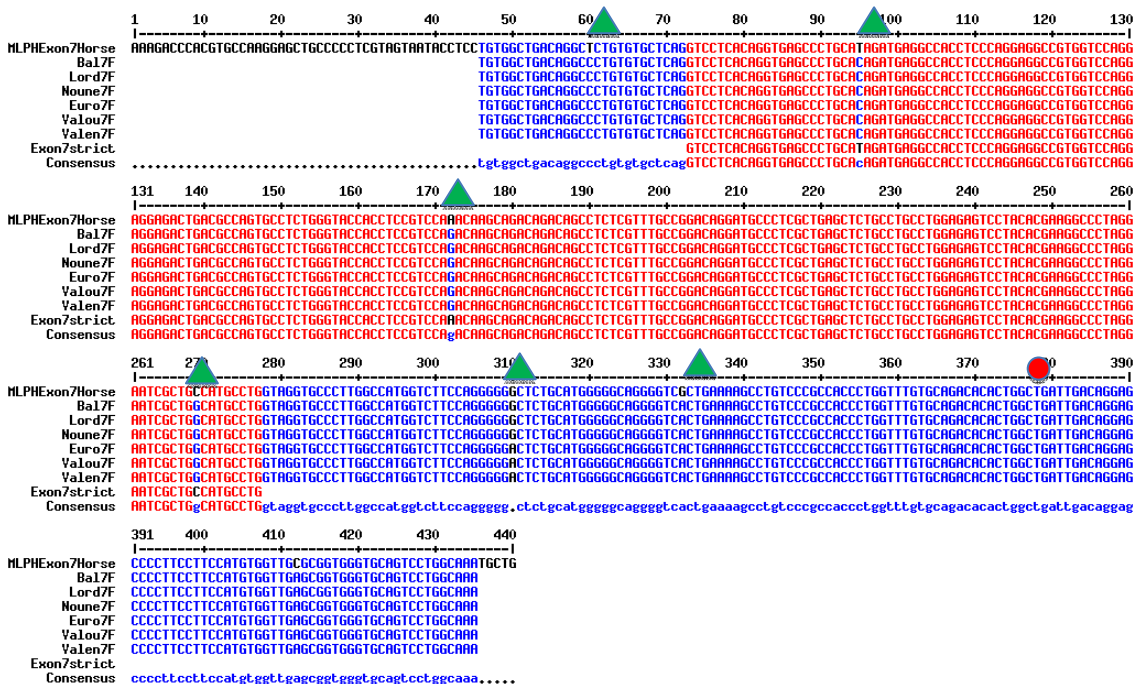
Annexe 63: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 6 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 63: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 6

SNP entre ânes ●		SNP 1 (377)	SNP Cheval/Âne ▲		
Normand	Balthazar	C	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	C	1 (209)	C	T
Grand Noir du Berry	Noune	C/T	2 (211)	G	A
Grand Noir du Berry	Lord	C	3 (293)	A	G
Provence	Valence	C	4 (336)	A	G
Provence	Valouse	C	5 (340)	G	A
Cheval	Ensembl	C	6 (378)	A	G

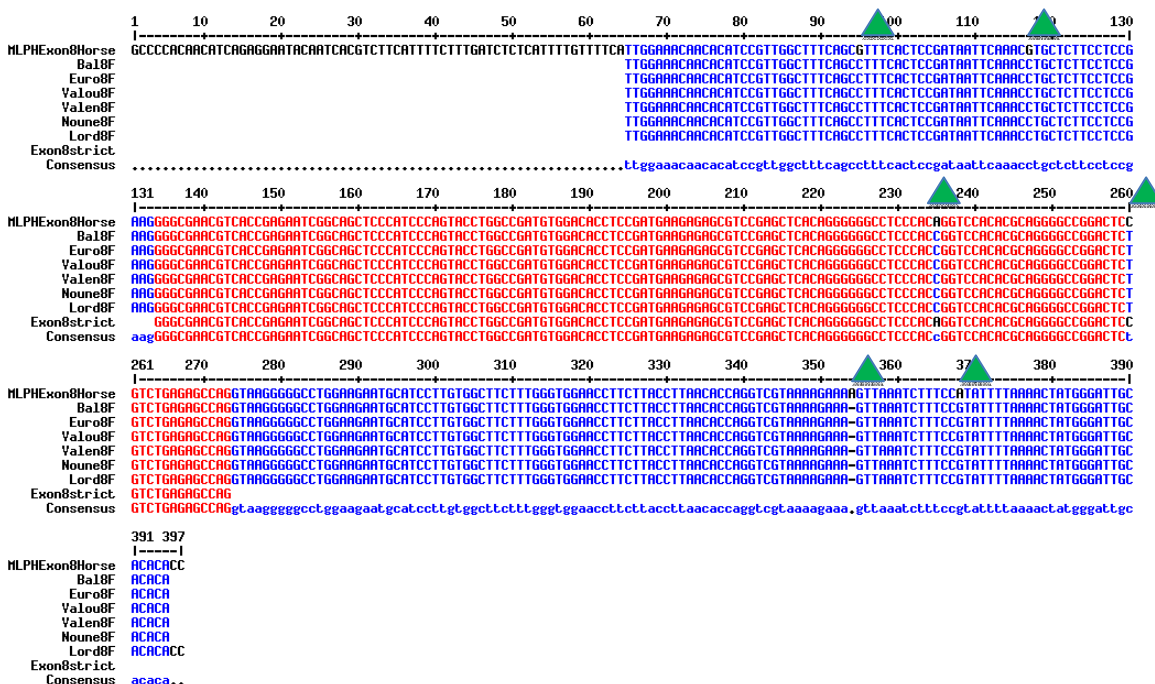
Annexe 64: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 7 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 64: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 7

SNP entre ânes		SNP 1 (377)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	G	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A/G	1 (60)	T	C
Grand Noir du Berry	Noune	G	2 (95)	T	C
Grand Noir du Berry	Lord	G	3 (172)	A	G
Provence	Valence	A/G	4 (269)	C	G
Provence	Valouse	A/G	5 (332)	G	A
Cheval	Ensembl	G	6 (412)	C	A

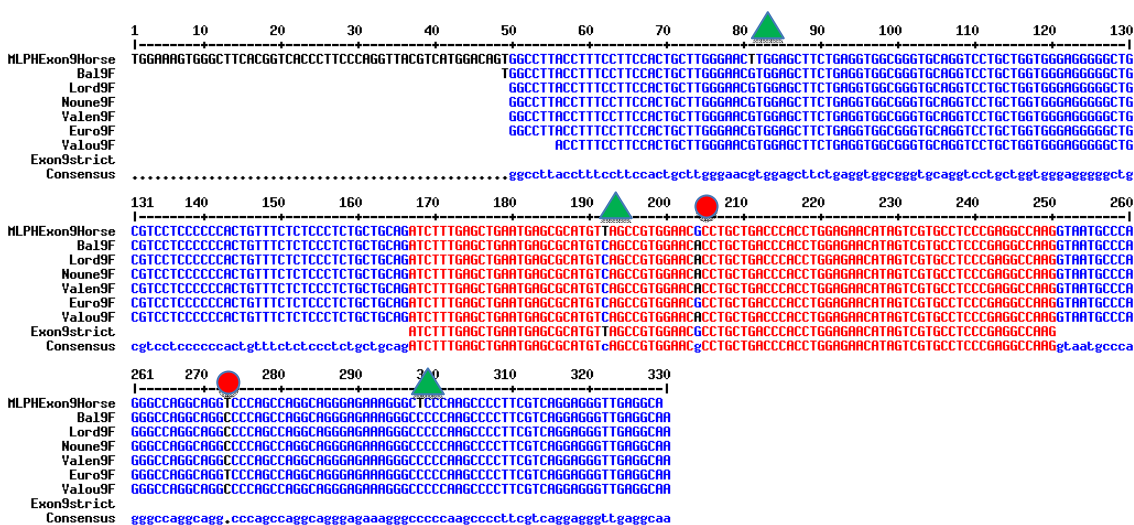
Annexe 65: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 8 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 65: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 8

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 95)	G	C
2 (pos 117)	G	C
3 (pos 235)	A	C
4 (pos 260)	C	T
5 (pos 354)	A	-
6 (pos 378)	A	G

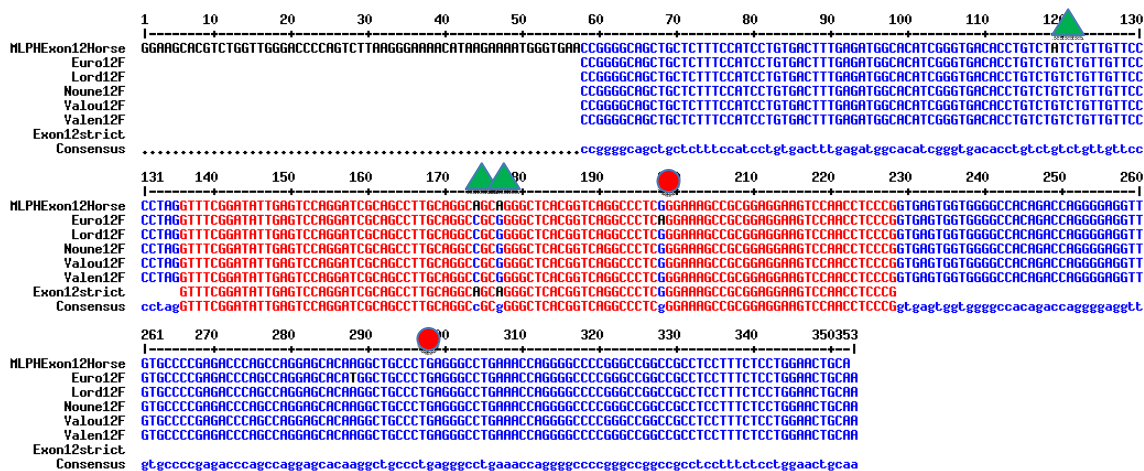
Annexe 66: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 9 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 66: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 9

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 204)	SNP 2 (pos 273)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	A	C	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A/G	C/T	1 (pos 81)	T	G
Grand Noir du Berry	Noune	A	C	2 (pos 192)	T	C
Grand Noir du Berry	Lord	A	C	3 (pos 298)	T	C
Provence	Valence	A	C			
Provence	Valouse	A	C			
Cheval	Ensembl	A	C			

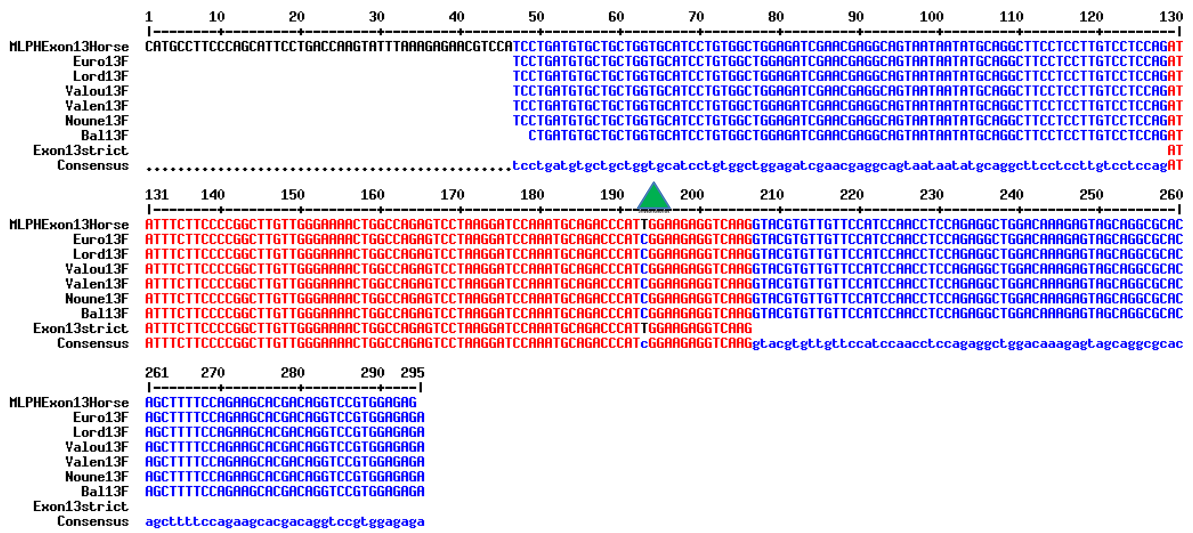
Annexe 67: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 12 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 67: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 12

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 198)	SNP 2 (pos 298)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	?	?	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	A	T	1 (pos 119)	A	G
Grand Noir du Berry	Noune	G	A	2 (pos 174)	A	C
Grand Noir du Berry	Lord	G	A	3 (pos 177)	A	G
Provence	Valence	G	A			
Provence	Valouse	G	A			
Cheval	Ensembl	G	A			

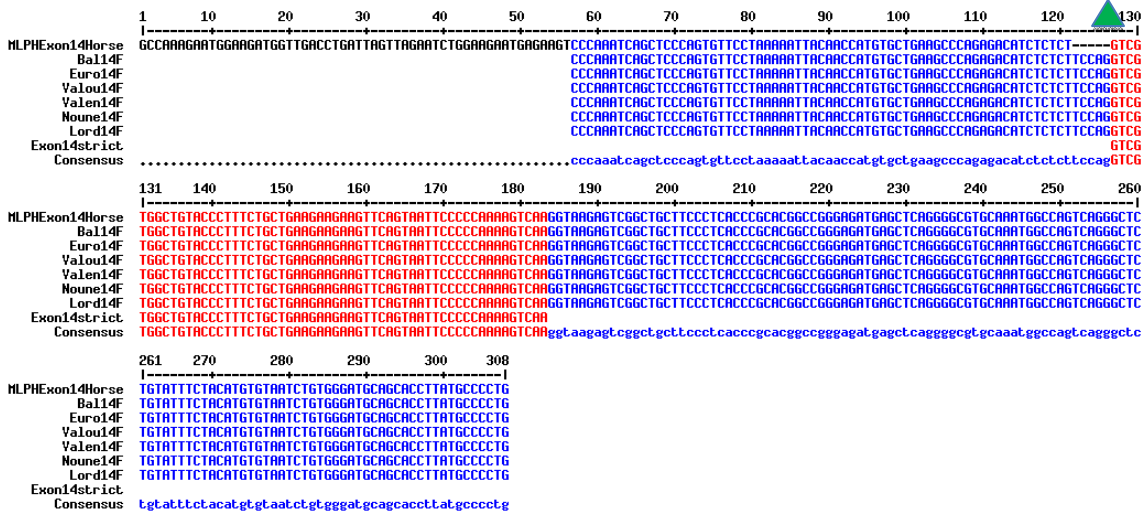
Annexe 68: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 13 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 68: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 13

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 193)	T	C

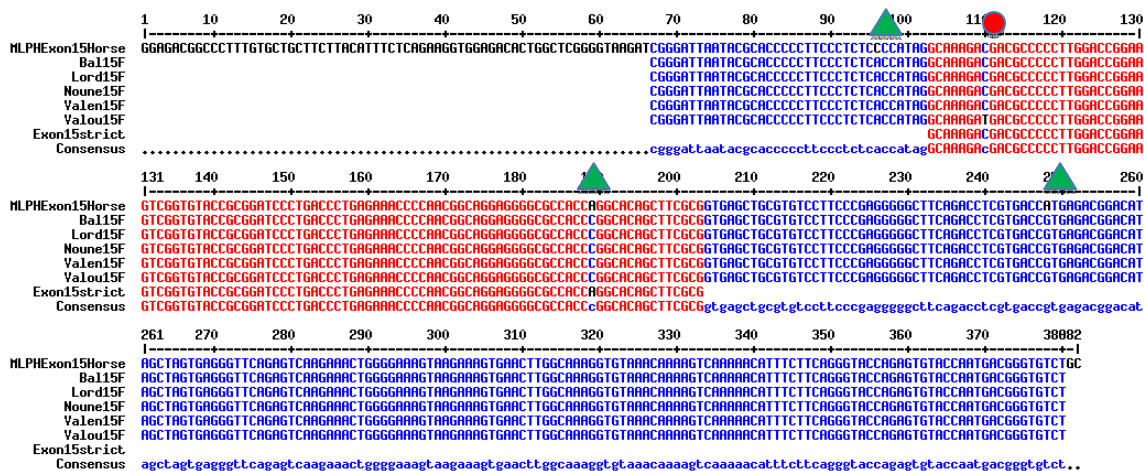
Annexe 69 : Alignement de séquences pour *MLPH* exon 14 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 69: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 14

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 122-126)	----	TCCAG

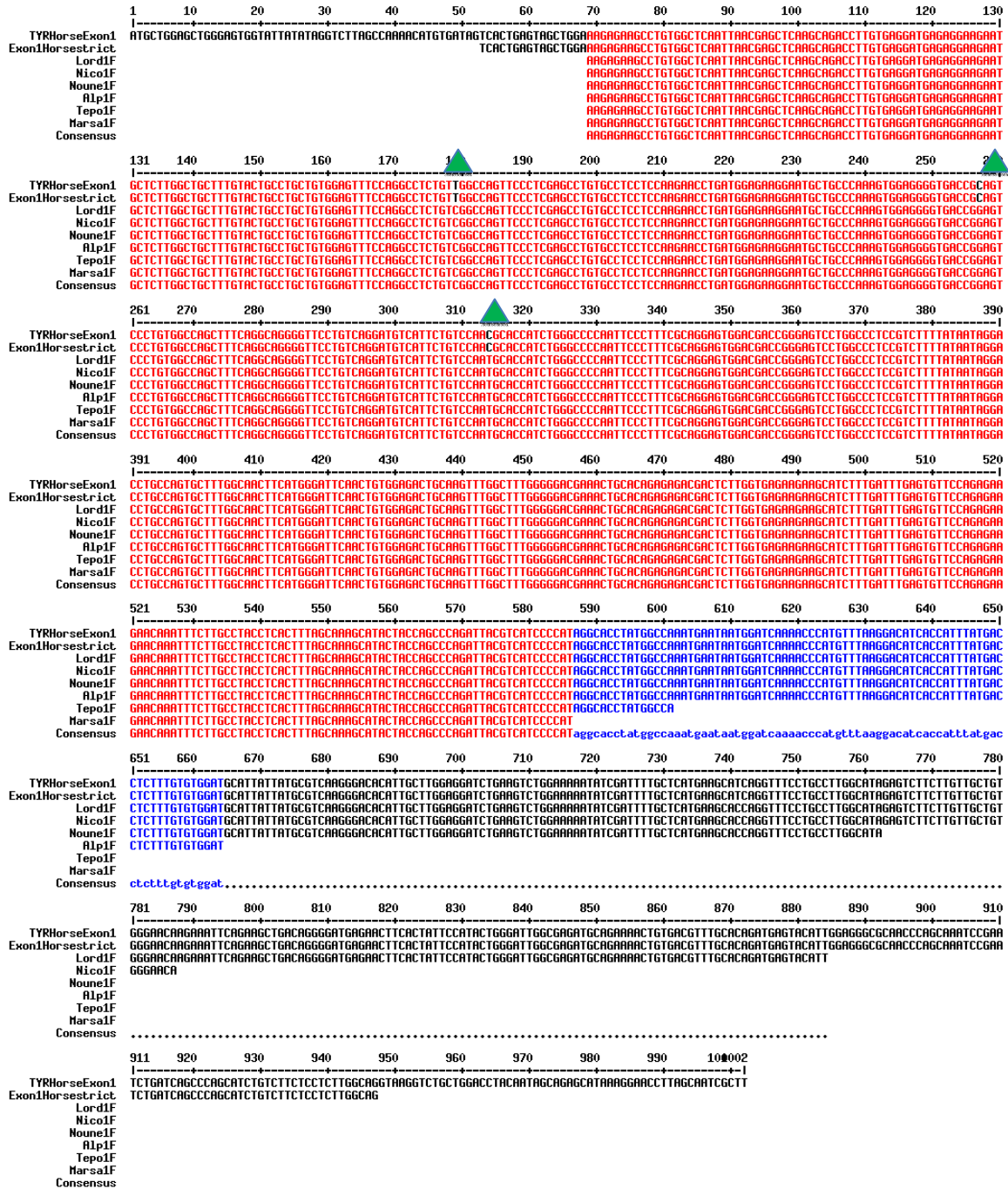
Annexe 70: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 15 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 70: Alignement de séquences pour *MLPH* exon 15

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 110)	SNP Cheval/Âne		
Normand	Balthazar	C	Position	Cheval	Ânes
Normand	Euro	?	1 (pos 96)	C	A
Grand Noir du Berry	Noune	C	2 (pos 189)	A	C
Grand Noir du Berry	Lord	C	3 (pos 248)	A	G
Provence	Valence	C			
Provence	Valouse	C/T			
Cheval	Ensembl	C			

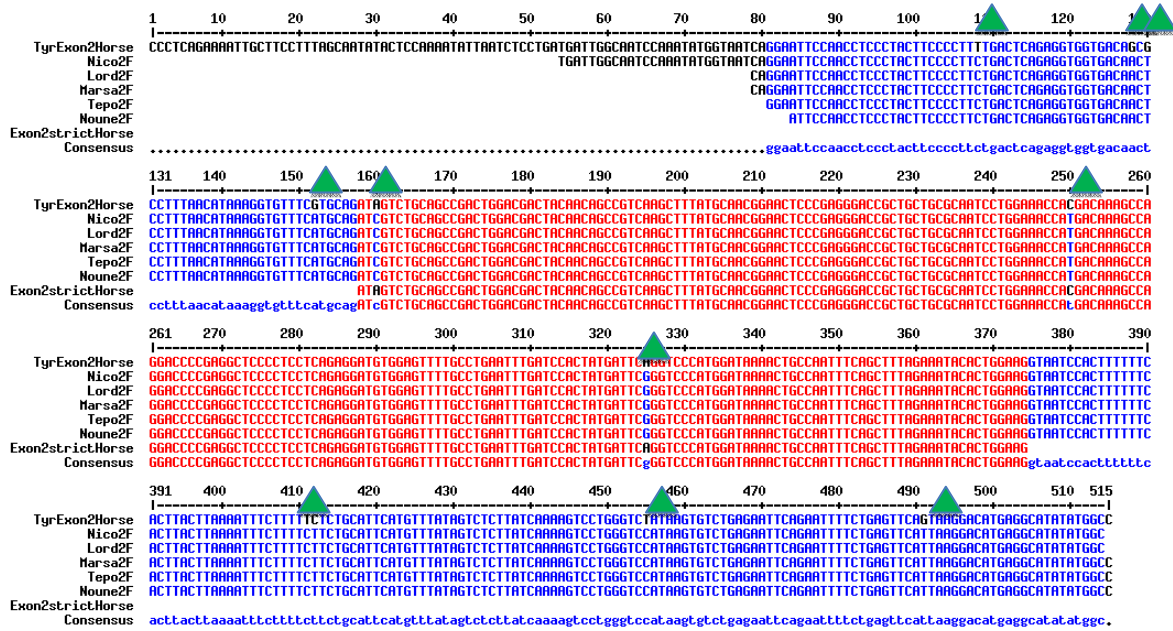
Annexe 71: Alignement de séquences pour *TYR* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue



Annexe 71: Alignement de séquences pour *TYR* exon 1

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 179)	T	C
2 (pos 257)	G	C
3 (pos 313)	C	T

Annexe 72: Alignement de séquences pour *TYR* exon 2 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 72: Alignement de séquences pour *TYR* exon 2

	SNP Cheval/Âne	
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 108)	T	C
2 (pos 128)	G	A
3 (pos 130)	G	T
4 (pos 152)	G	A
5 (pos 160)	A	C
6 (pos 250)	C	T
7 (pos 325)	A	G
8 (pos 411)	T	C
9 (pos 455)	T	C
10 (pos 491)	G	T

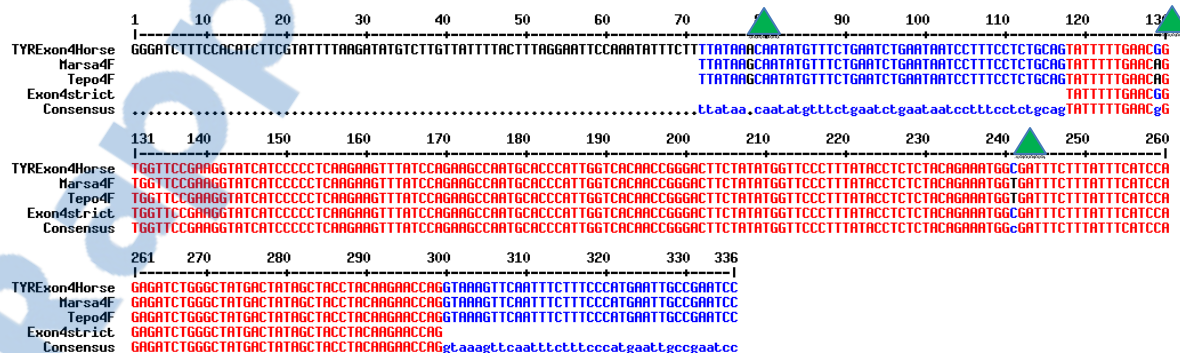
Annexe 73: Alignement de séquences pour *TYR* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 73: Alignement de séquences pour *TYR* exon 3

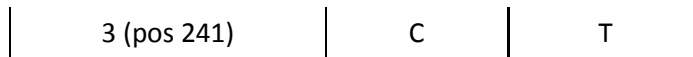
SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 385)	C	T

Annexe 74: Alignement de séquences pour *TYR* exon 4 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données

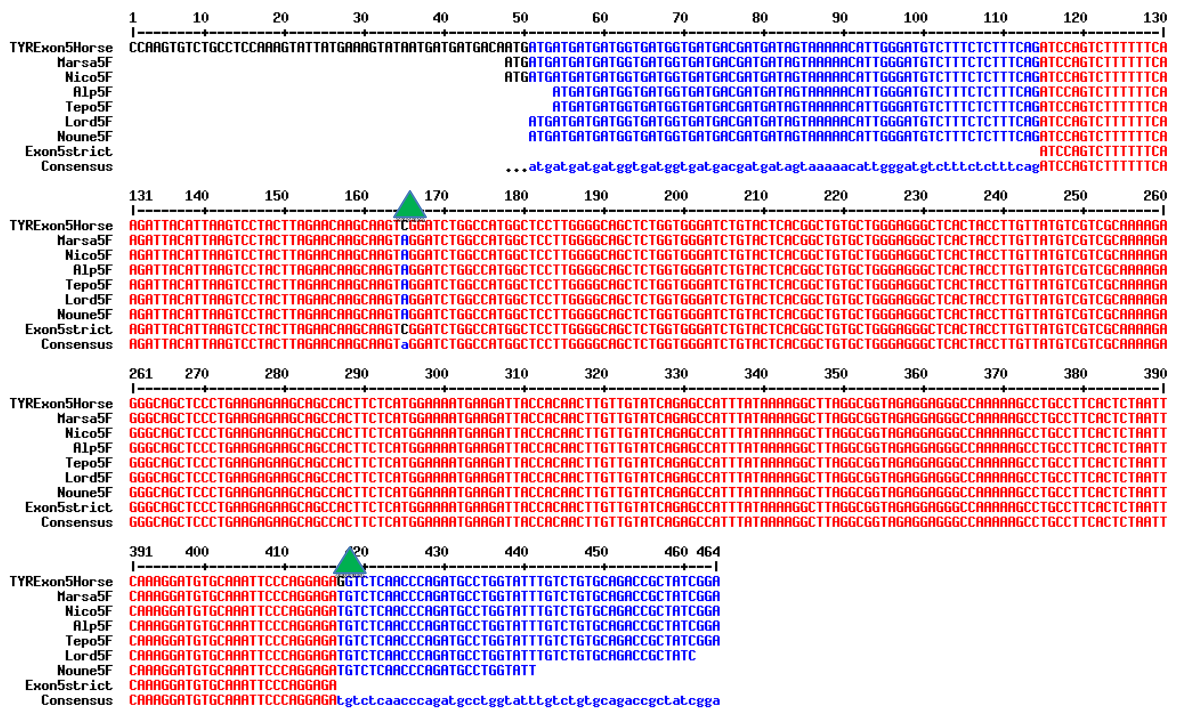


Annexe 74: Alignement de séquences pour *TYR* exon 4

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 78)	A	G
2 (pos 129)	G	A



Annexe 75: Alignement de séquences pour *TYR* exon 5 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données

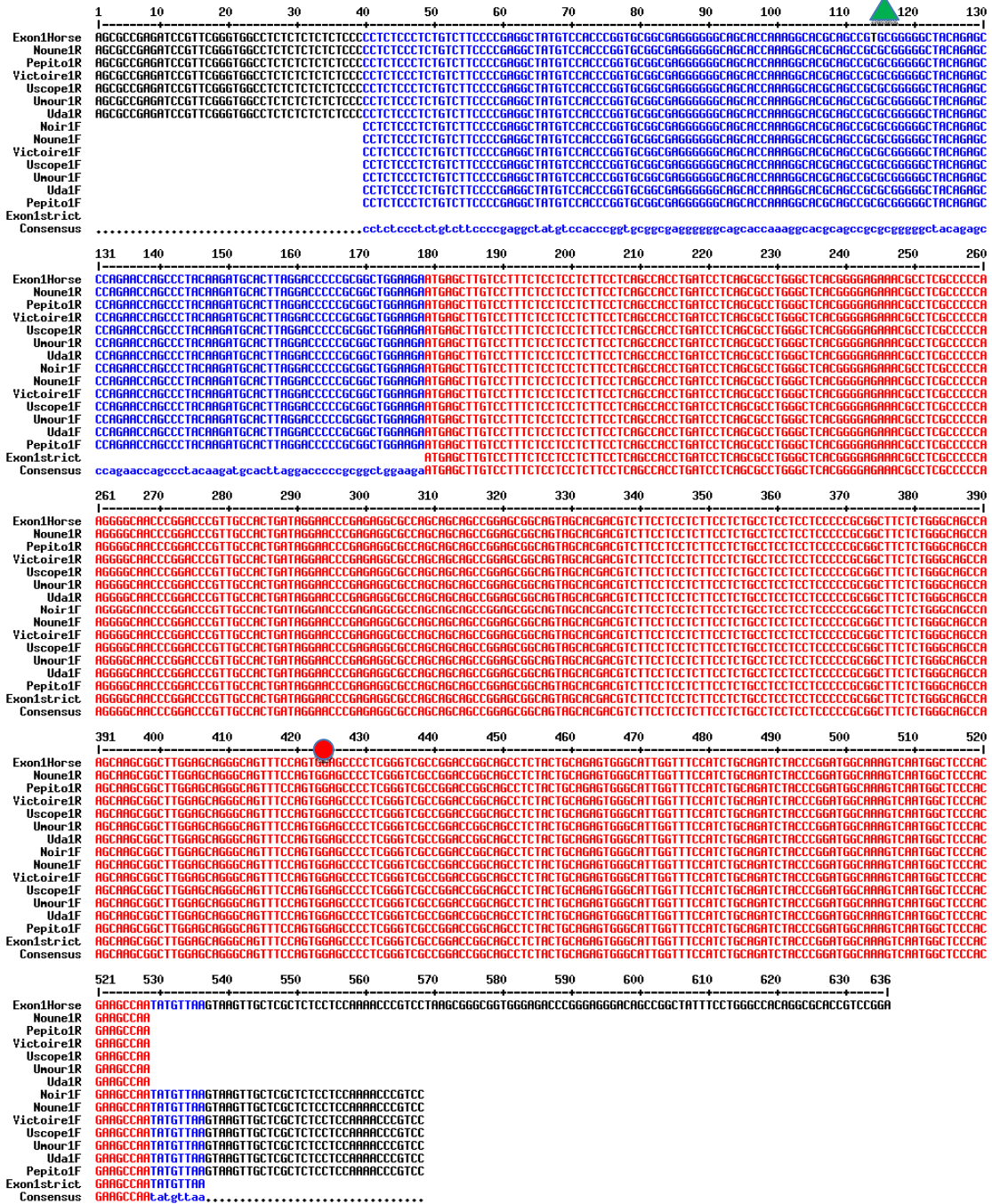


Annexe 75: Alignement de séquences pour *TYR* exon 5

SNP Cheval/Âne		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 165)	C	A
2 (pos 417)	G	T



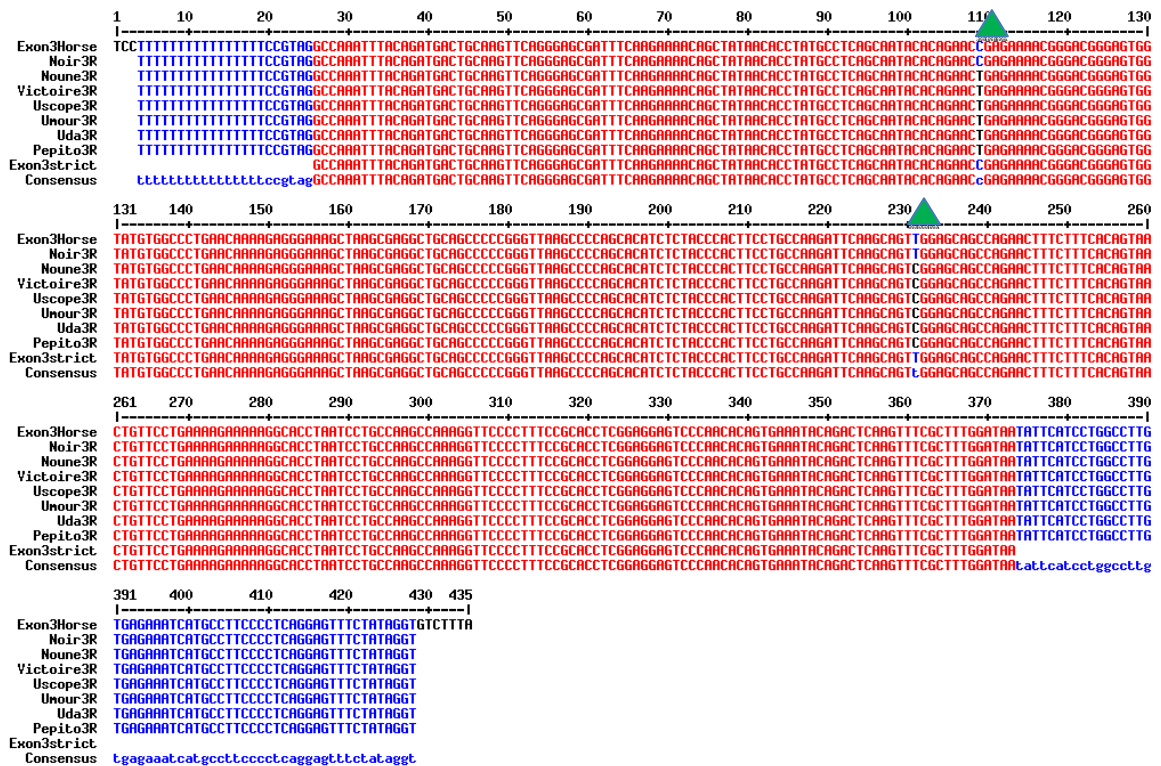
Annexe 76: Aligement de séquences pour *FGF5* exon 1 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données




Annexe 76: Aligement de séquences pour *FGF5* exon 1

SNP entre ânes		SNP 1 (pos 423)	SNP Cheval/Âne		
			Position	Cheval	Ânes
Grand Noir du Berry	Noune	G	1 (pos 114)	T	C
Grand Noir du Berry	Uscope	G/A			
Baudet du Poitou	Pepito	G/A			
Baudet du Poitou	Victoire	G			
Baudet du Poitou	Umour	G			
Baudet du Poitou	Uda	G			
Cheval Noir	Témoins	G			

Annexe 78: Alignement de séquences pour *FGF5* exon 3 entre les ânes témoins et la séquence du cheval issue des bases de données



Annexe 78: Alignement de séquences pour *FGF5* exon 3

SNP Cheval/Âne 		
Position	Cheval	Ânes
1 (pos 109)	C	T
2 (pos 231)	T	C

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET MOLÉCULAIRE DE LA COULEUR ET DE LA TEXTURE DU PELAGE CHEZ LES PRINCIPALES RACES ASINES FRANÇAISES

NOM et Prénom : LEGRAND Romain

Résumé

Bien que membres de la même famille des équidés et souvent comparés, ânes et chevaux possèdent des caractères phénotypiques différents. Les couleurs de robes sont différentes et le vocabulaire employé pour les chevaux correspond mal à ce que l'on observe dans l'espèce asine. A ce jour, les gènes impliqués dans le déterminisme de la couleur de la robe ont été bien étudiés chez le cheval mais les données concernant les ânes sont inexistantes. Cette étude visait à établir les bases moléculaires des différentes couleurs observées ainsi qu'à proposer une terminologie pour les principales races d'ânes françaises. A l'aide d'échantillons d'ADN extraits d'individus de cinq races françaises, nous avons tenté d'identifier les mutations à l'origine des différentes couleurs de robes (Noire, Bai, Grise), des marques primitives (tête de maure, croix scapulaire, raie de mulet et zébrures des membres) ainsi que du phénotype poil long des baudets du Poitou. Pour ce faire nous avons sélectionné puis séquencé 12 gènes candidats choisis en nous basant sur la bibliographie existante. Notre étude a permis de montrer qu'aucun des gènes testés, classiquement impliqués dans d'autres espèces (cheval, vache, chien, chat, souris) ne permettait d'expliquer les variations observées chez les ânes. En revanche nous avons mis en évidence une mutation responsable du phénotype poils longs chez les baudets du Poitou.

Mots clés : GENETIQUE, ROBE, COULEUR, POIL, POIL LONG, ADN, EQUIDE, RACE ASINE, ÂNE, BAUDET

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr Abitbol M.

Assesseur : Pr Bossé P.

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE COAT COLOR AND TEXTURE IN THE MAIN FRENCH DONKEY'S BREEDS

SURNAME : LEGRAND

Given name : Romain

Summary

Although they are both members of the same family of Equidae and often compared, donkeys and horses possess different phenotypic characters. The coat colors are different and the vocabulary used for horses not always corresponds to what we observe in the asine species. To that day, the genes involved in the determinism of the coat color begin to be well known for the horse but the data concerning donkeys are non-existent. This study aimed at establishing the molecular bases of the various colors observed as well as proposing a terminology for the main French races of donkeys. By means of samples of DNA extracted from individuals of five French races, we tried to identify the mutations at the origin of the various coat colors (Black, Brown, and Gray), of the primitive marks, (darker head, cross scapula, back stripe and stripes on the members) as well as of the phenotype long hair observed in the Baudets du Poitou. For that purpose we selected and then sequenced 12 candidate genes by using the existing bibliography. Our study showed that none of the tested genes, classically involved in other species (horse, cow, dog, cat, mouse) allowed to explain the variations observed in donkeys. We also highlighted a mutation responsible for the phenotype long hairs in the Baudets du Poitou.

Keywords: GENETIC, COAT, COLOUR, HAIR, LONG HAIR, DNA, EQUIDAE, DONKEY'S BREED, DONKEY, BAUDET

Jury :

President : Pr.

Director : Dr Abitbol M.

Assessor : Pr Bossé P.