

IDENTIFICATION DE MUTATIONS À L'ORIGINE DE DIFFÉRENTS PHÉNOTYPES CHEZ LES ÂNES

IDENTIFICATION OF MUTATIONS AT THE ORIGIN OF VARIOUS PHENOTYPES IN DONKEYS

Par Romain LEGRAND⁽¹⁾, Marie ABITBOL⁽²⁾
(Communication présentée le 2 Juin 2016
Manuscrit accepté le 12 Juin 2016)

RÉSUMÉ

Publiées depuis le début des années 1990, de nombreuses observations décrivent l'effet de mutations ponctuelles affectant les gènes responsables des différentes couleurs de la robe du cheval. Par contre, à ce jour, aucune étude n'a encore été consacrée à l'espèce asine, bien que celle-ci, en dépit de sa grande proximité phylogénique, présente des phénotypes très différents de ceux du cheval. Notre étude permet d'établir les bases génétiques de deux particularités : la robe à poils longs, caractéristique des Baudets du Poitou, et la décoloration observée autour du museau, des yeux et au niveau des membres et appelée *Pangaré*. Pour accomplir cette analyse, nous utilisons une approche par gènes candidats basée sur les données de la littérature concernant le cheval et d'autres espèces de mammifères. Par cette approche, nous mettons en évidence deux mutations dans le gène *FGF5*, toutes les deux responsables du phénotype *poils longs*, et une mutation dans le gène *ASIP*, associée au phénotype *bouchard* ou *non pangaré*.

Mots-clés : ânes, poils longs, baudets du Poitou, *Pangaré*, *bouchard*.

ABSTRACT

From 1990s, many results have described punctual mutations in the genes responsible for different colors of dresses of horses, but to day no study had been achieved for the asinine species, which display very different phenotypes although a close phylogenetic neighboring. Our study was designed to try to establish the genetic basis of two features: the long hair dress found in Baudets du Poitou, and the discoloration observed around the muzzle, eyes and limbs and which is called *Light Point*. We have so adopted an approach by candidate genes from the existing literature in horses and other mammals. By this approach two mutations have been identified in the gene *FGF5* responsible for the phenotype long hair and one mutation in the gene *ASIP* was associated with the phenotype *No Light Point*.

Key words: donkeys, long hair coat, baudets of Poitou, *No Light Point*.

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 de l'Homme durant des siècles, la population asine connaît au XX^{ème} siècle une forte décroissance avec l'avènement des machines à moteur, les races françaises ayant même failli disparaître. Il ne reste en 1977 que 44 Baudets du Poitou, seule race alors officiellement reconnue (source : Haras-Nationaux).

Grâce à l'implication de passionnés et la reconnaissance des autres races d'ânes françaises par les haras nationaux et le ministère de l'agriculture, des programmes de conservation ont été mis en action, avec pour conséquence un regain d'intérêt à l'espèce asine dont on recense désormais plus de 60 000 individus sur le territoire national.

(1) 1 Bd Baie Saint Paul, 17500 Jonzac.

Courriel : romainlegrand.vet@gmail.com

(2) Marie Abitbol, IMRB U955-E10 Groupe de Génétique Médicale Comparée, École nationale vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, maintenant à VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile

Courriel : marie.abitbol@vetagro-sup.fr

À la suite des travaux effectués chez la souris dans les années 1990 et à partir des années 2000 chez le cheval, de nombreuses publications rapportent 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 (Bultman *et al.* 1992, 1994; Rieder *et al.* 2001 ; Kerns *et al.* 2004 ; Fontanesi *et al.* 2010). A ce jour, aucune étude n'a encore été menée dans l'espèce asine afin d'identifier le déterminisme moléculaire de la couleur de la robe.

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*, voire noir pangaré suivant la terminologie utilisée chez le cheval, terminologie pas tou-

jours adaptée aux robes asines. Le phénotype *poils longs*, très commun chez les animaux domestiques, est rarement observé chez les équidés, à l'exception de la race asine française des baudets du Poitou. Ceux-ci sont caractérisés par une toison épaisse constituée de poils à pousse continue formant des genres de dreadlocks. Les croisements permettent de montrer que ce phénotype est récessif, en effet les Baudets croisés F1 sont toujours à poils courts (**figure 1**). La plupart des ânes français présentent une robe avec une décoloration au niveau du ventre, des yeux et du museau. Les ânes normands donnent occasionnellement naissance à des individus *bouchards*, sans décoloration du ventre et du museau (*ânes bouchards*) (**figure 2**).

Notre étude vise 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. Deux

particularités ont retenu notre attention : la robe à poils longs retrouvée chez les Baudets du Poitou et la décoloration observée autour du museau, des yeux et au niveau des membres, appelée *pangaré*, l'absence de cette décoloration étant appelée *bouchard* ou *non pangaré*.

Nous avons préféré adopter une approche par gènes candidats, plus simple, plus logique et moins coûteuse que le séquençage direct. À partir de la littérature existante chez le cheval et d'autres espèces de mammifères, nous avons sélectionné puis séquencé les segments d'ADN les plus susceptibles de contenir les mutations à l'origine des principales robes rencontrées chez les ânes : *noir*, *bai* et *gris*, ainsi que du phénotype *poils longs*.

Nous avons ainsi séquencé de nombreux gènes candidats comme *ASIP*, *BD103* et *MC1R* pour la couleur noire, *TYR*, *TYRP1* et *TYRP2* pour la couleur bai/chocolat ou encore *BLOC1S4*, *KITL*, *MLPH*, *PMEL17*, *RAB27*, *MYO5* et *VPS33* pour la couleur grise. Bien que ce séquençage des séquences codantes ait permis de mettre en évidence des SNP (*single-nucleotide*

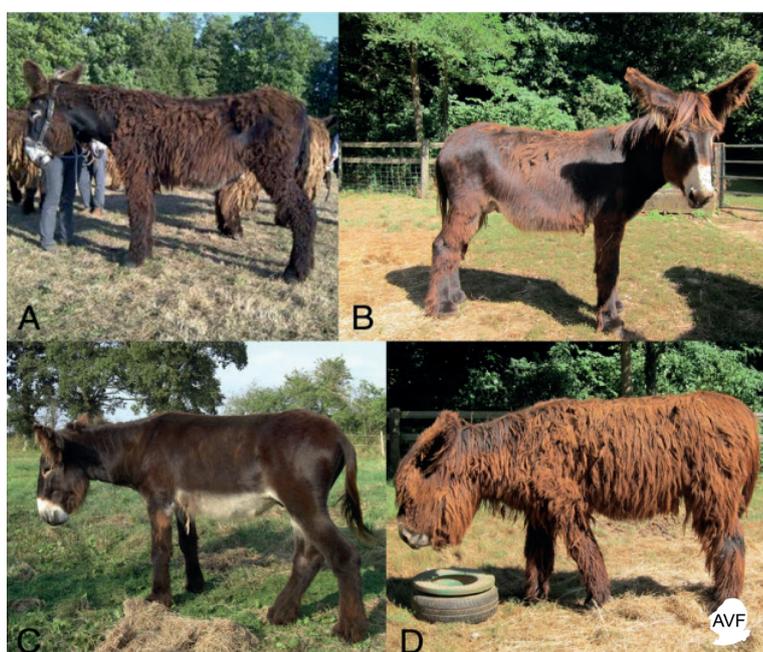


Figure 1 : Le phénotype *poils longs* chez les baudets du Poitou.

Les baudets présentent une pousse continue du poil, les jeunes animaux présentent généralement une robe mi-longue avec des zones plus courtes (A, B, C), tandis que les individus plus âgés présentent une robe longue uniforme et drue (D).



Figure 2 : Le phénotype *Pangaré* et *bouchard* chez les ânes. La plupart des ânes français présentent une robe avec une décoloration au niveau du ventre, des yeux et du museau (âne Normand à gauche). Les ânes normands donnent occasionnellement naissance à des individus *bouchards*, sans décoloration du ventre et du museau (*ânes bouchards* au centre et à droite).

polymorphism ou polymorphisme d'un seul nucléotide) inter et intraspécifiques, nous n'avons pas mis en évidence de mutations associées aux phénotypes observés, mis à part les cas de *ASIP* que nous rapportons ici.

Nous rapportons ici les résultats obtenus pour la mutation au locus *FGF5*, responsable du phénotype *poils longs* du baudet, et de la mutation dans *ASIP* associée au phénotype *bouchard* (ou *non pangaré*), caractérisé par l'absence de décoloration des extrémités.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Recrutement des animaux

Les animaux sont recrutés auprès de propriétaires par l'intermédiaire des clubs de race auxquels ils appartiennent et avec l'agrément de l'Institut National Asin et Mulassier (INAM) qui a encadré et financé cette étude.

Pour chaque animal intégré à l'étude, il est demandé au propriétaire de nous faire parvenir :

- deux 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, au cas où celle-ci est 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 sont conservés au réfrigérateur à +4°C avant envoi à température ambiante par lettre simple. Ils sont stockés au froid dès leur réception. Les échantillons (n=119) proviennent d'ânes du Cotentin (n=10), d'ânes normands (n=26), d'ânes de Provence (n=17), d'ânes Grand Noir du Berry (n=8), d'ânes des Pyrénées (n=14), de baudets du Poitou (n=42), d'ânes du Bourbonnais (n=2).

Nous utilisons comme témoins des échantillons d'ADN de 131 chevaux collectés préalablement pour d'autres études au laboratoire. Ce panel comporte 40 pur-sang anglais, 40 chevaux de selle français, 26 pur-sang arabes, huit Connemara, un islandais, sept Haflinger, trois Pottok et six Poneys Shetlands.

Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir des échantillons de sang, des brochettes buccales ou des follicules pileux en utilisant l'automate Maxwell® 16 Instrument (Promega Corporation, Madison, USA), selon les recommandations du fabricant.

Amorces, amplification et séquençage

Le génome de l'âne n'étant pas séquençé à l'époque de notre travail, nous utilisons comme référence la séquence du génome du cheval telle qu'elle est accessible dans les bases de données Ensembl : (<http://www.ensembl.org/index.html>) pour dessiner les amorces de PCR nécessaires au séquençage des différents exons et le programme Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

L'amplification des séquences est réalisée par PCR avec des trousseaux QBiogen S.A. France, (Courtaboeuf, France) et selon le cycle suivant :

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

Les produits de PCR obtenus sont ensuite séquençés en utilisant la méthode Sanger au laboratoire GATC (GATC Biotech, Constance, Allemagne, www.gatc-biotech.com). Les séquences sont comparées et alignées en utilisant le logiciel Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), et la visualisation des chromatogrammes de séquençage est réalisée à l'aide du logiciel Chromaslitte 2.01 (Technelysium Pty Ltd : www.technelysium.com.au).

Séquençage de *FGF5*

Le séquençage de *FGF5* est réalisé en utilisant les amorces présentées dans le **tableau 1** (Gene équin *FGF5*, [Ensembl:ENSECAG00000015710])

Une fois les alignements réalisés, une délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 est génotypée par pyroséquençage avec la méthode adaptée de Ahmadian *et al.* (2000) sur un pyroséquenceur PyroMark Q96 ID (Qiagen, Hilden, Allemagne), en utilisant les amorces de PCR *forward* et *reverse* suivantes 5' -AATACGAGGAGTTTTTCAGCAACAA-3 et 5' -BIOTIN-CCTGCATGGAGTTTTTCCTTTTT-3 pour le séquençage et l'amorce 5' -AGCAACAAATTTTTAGCG-3' pour le pyroséquençage.

L'impact potentiel de la mutation sur la protéine produite est évalué en utilisant le programme Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei *et al.* 2010).

FGF5	Tm °C	Amorce Forward	Amorce reverse	Produit de PCR
FGF5 exon 1	58 °C	agcgccgagatccggtc	ggacgggttttgaggag	568 pb
FGF5 exon 2	53 °C	tgagtaataagaatggaag	tgattcattctcaaacg	270 pb
FGF5 exon 3	58 °C	gccatggaattcttggtc	gctgaagctgtgtccaaagt	425 pb

Tableau 1 : Amorces utilisées dans le séquençage du gène *FGF5*.

RÉSULTATS

Mutation au locus *FGF5*, responsable du phénotype *poils longs* du baudet

Pour fournir aux éleveurs un test ADN fiable permettant de détecter les porteurs du gène *poils longs* dans la descendance croisée des Poitou, nous cherchons une mutation pouvant être à l'origine de ce phénotype dans le gène *FGF5*, un des gènes impliqués dans la croissance du poil. Pour couvrir les trois exons de *FGF5* et les séquences d'introns voisines, nous utilisons des jeux d'amorces en nous basant sur le génome équin référencé. Un échantillon est sélectionné, composé de trois baudets du Poitou à poils longs et de deux ânes témoins noirs du Berry. On réalise ensuite une PCR pour obtenir des séquences de taille compatible avec *FGF5*. Les alignements permettent de révéler une compatibilité de 99,7 % entre les séquences codantes *FGF5* chez le cheval et l'âne, confirmant que les deux gènes sont orthologues. De plus, la comparaison base à base des deux séquences (âne vs cheval de référence) révèle deux variations interspécifiques, un SNP intraspécifique et une délétion de deux paires de bases dans l'exon 2 chez les baudets.

L'analyse des deux variants interspécifiques montre qu'il s'agit d'une mutation synonyme et d'une mutation non synonyme qui, d'après les données du logiciel PolyPhen-2, n'ont pas d'impact sur la fonction de *FGF5*. En revanche, le SNP entre ânes consiste en une mutation non-sens (c.245G > A) amenant un codon stop à la position 82 dans *FGF5* tandis que la délétion de deux paires de bases (c.433_434delAT) produit un décalage du cadre de lecture résultant en l'apparition d'un codon stop à la position 159.

	N/N	N/del	del/del	Total
Ânes des Pyrénées	11	2	0	13
Ânes de Provence	16	0	0	16
Ânes Normands	17	1	0	18
Grands Noirs du Berry	8	0	0	8
Ânes du Cotentin	10	0	0	10
Ânes du Bourbonnais	1	1	0	2
Baudets du Poitou	0	4	31	35
Total des Ânes	63	8	31	102
Chevaux des poneys issus de neuf races	131	0	0	131

Tableau 2 : Génotype des ânes et chevaux pour la délétion c.433_434delAT.

ASIP	Tm °C	Amorce Forward	Amorce reverse	Produit de PCR
ASIP exon 1	60°C	acctgctgactgcttc	ccttctcatggctggag	253 pb
ASIP exon 2	60 °C	tgagtccctcactct	tcctagccagagcttgagg	202 pb
ASIP exon 3	60 °C	cggcctcatagccaag	cccgcctcctaagaagctc	419 pb

Tableau 3 : Amorces utilisées dans l'amplification des trois exons du gène *ASIP*.

Nous génotypons ensuite l'ensemble de la cohorte, représentant 102 ânes issus des sept races françaises, pour le SNP c.245G > A et la délétion c.433_434delAT. Parmi les 35 baudets au phénotype *poils longs*, 31 sont homozygotes pour la délétion, tandis que quatre baudets, deux ânes des Pyrénées, un normand et un bourbonnais sont hétérozygotes, également pour la mutation non-sens c.245G > A. Les 63 ânes à poils courts restants sont homozygotes pour l'allèle sauvage. En génotypant en plus 131 chevaux et poneys issus de neuf races, nous ne parvenons pas à identifier la délétion dans ce panel, ce qui renforce l'association ($\chi^2 = 2.62 \times 10^{-20}$) entre la délétion observée chez les baudets et le phénotype *poils longs* dans cette race (tableau 2).

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la délétion c.433_434delAT induit un décalage du cadre de lecture conduisant à un codon stop prématuré en position 159 dans la protéine. Pour évaluer l'impact fonctionnel de cette mutation sur *FGF5*, nous utilisons des modèles 3D en comparant notre protéine mutée à cinq protéines FGF humaines comme références. Les simulations montrent que la protéine tronquée est amputée de sept de ses 12 feuillets caractéristiques des protéines FGF, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle cette délétion affecte le fonctionnement de la protéine *FGF5*. De la même manière, les modèles prédisent, suite à la mutation c.245G > A, une perte de fonction pour la protéine tronquée à laquelle il manque tous les feuillets β .

Pour conclure, nous pensons que la délétion c.433_434delAT identifiée chez tous les Baudets constitue la mutation récessive à l'origine du phénotype *poils longs* observé dans cette race.

Mutation dans *ASIP* responsable du phénotype *bouchard* (ou *non pangaré*)

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle du gène *ASIP* et de différentes mutations dans celui-ci dans l'obtention de robes noires unies chez de nombreuses espèces de mammifères, aussi constitue-t-il un bon candidat pour le phénotype *bouchard* ou *non pangaré* (figure 2).

Pour la recherche de variants touchant à la fonction d'*ASIP*, nous utilisons le génome de quatre individus, deux *pangarés* et deux *non pangarés*, originaires de notre échantillon (119 ânes *pangarés* et neuf ânes *non pangarés*). La séquence de référence d'un cheval *bai* nous a servi pour dessiner trois sets d'amorces qui permettent avec succès l'amplification des trois exons du gène *ASIP* chez l'âne (tableau 3).

Nous séquençons les amplifications obtenues et comparons, base à base, les séquences asines et la séquence de référence. Les séquences codantes et les séquences en bordure des exons sont très conservées entre le cheval et l'âne

et nous ne détectons que deux variations entre les séquences asines et la séquence équine de référence. De ces deux mutations, seul le SNP c.349 T>C produit une substitution Cys117Arg et peut être en accord avec le mode de transmission récessif du motif *non pangaré*. En effet, les deux ânes *non pangarés* sont homozygotes C/C pour la mutation c.349 T>C, tandis qu'un des ânes témoins est hétérozygote C/T et l'autre âne témoin, ainsi que le cheval de référence, homozygotes T/T. L'utilisation de Polyphen-2 prédisant que la substitution est délétère, nous génotypons l'ensemble de la cohorte pour le SNP c.349 T>C (**tableau 4**). Les neuf ânes *non pangarés* se sont révélés homozygotes C/C, tandis que l'ensemble des ânes *pangarés* apparaissent homozygotes T/T (n=104) ou hétérozygotes C/T (n=14). Les trois normands *non pangarés*, issus du croisement d'un même mâle avec trois femelles différentes, se sont révélés tous hétérozygotes C/T. La concordance complète entre le comportement récessif du motif *non pangaré* et la présence de la mutation c.349 T>C est très en faveur de notre hypothèse d'association entre ce SNP et le caractère *non pangaré* ($\chi^2=1,86 \times 10^{-29}$).

Pour estimer l'importance fonctionnelle de la cystéine en position 117, nous comparons la séquence de la protéine ASIP asine avec les séquences de protéine ASIP de neuf autres vertébrés et observons que ce résidu est totalement conservé, ce qui est en accord avec les travaux de Perry *et al.* (1996) qui montrent que des substitutions dans le domaine riche en cystéine de la queue de ASIP peuvent mener à une perte partielle ou totale d'activité de la protéine.

DISCUSSION

Phénotype *poils longs*

De nombreux articles mettent en évidence l'association entre le phénotype *angora* et des mutations du gène FGF5 (*fibroblast growth factor 5*) comme chez la souris où est montrée une délétion de 2 kb (Hébert *et al.* 1994; Sundberg *et al.* 1997; Mizuno *et al.* 2011;), chez le chien où une mutation faux-sens est identifiée chez les animaux à poils longs (Housley & Venta, 2006; Dierks *et al.* 2013) et chez le chat où quatre mutations dans FGF5 sont associées au phénotype *poils longs* (Drögemüller *et al.* 2007; Kehler *et al.* 2007).

Chez les mammifères, la croissance du poil est sous l'influence de nombreux facteurs comme le *tumor growth factor-1*, 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 diverses propriétés biologiques, parmi lesquelles on trouve le FGF5 associé à la pousse du poil. Chez la souris, la délétion de *Fgf5* entraîne anormalement la croissance du poil (Hébert *et al.* 1994) ; le récepteur de FGF5 est exprimé au niveau de la papille dermique du poil (Rosenquist

	T/T	T/C	C/C	Total
Ânes Grands noirs du berry, Pangaré	2	0	0	2
Ânes des Pyrénées, Pangarés	13	0	0	13
Baudets du Poitou, Pangaré	13	0	0	13
Ânes de Provence, Pangaré	12	2	0	14
Ânes Normands, Pangaré	26	6	0	32
Ânes Normands NON Pangaré	0	0	3	3
Ânes miniatures NON Pangaré	0	0	6	6
Ânes miniatures Pangaré	38	6	0	44
Total	104	14	9	127

Tableau 4 : Génotypes de la cohorte pour la mutation c.349T>C. Les mutants homozygotes sont surlignés.

& Martin, 1996). Selon Suzuki *et al.* (2000), le gène *Fgf5* est 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 : FGF-5S et FGF-5 sont exprimées spécifiquement en fin de phase anagène (synthèse du poil), mais les concentrations en FGF-5S diminuent ensuite rapidement avant le passage en phase catagène (régression du follicule pileux). La forme FGF-5S n'a pas d'activité seule mais permet 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.

Bien que le phénotype *poils longs* soit un caractère distinctif du baudet du Poitou, le mécanisme moléculaire responsable de ce phénotype n'a pour l'instant pas été rapporté. Notre approche par gènes candidats cible *FGF5*, un gène pour lequel des mutations perte de fonction ont déjà été reliées à un phénotype *poils longs* chez d'autres mammifères. Du fait de la forte conservation observée entre les séquences asines et la séquence équine de référence, nous avons amplifié avec succès la totalité de la séquence codante *FGF5* chez l'âne en utilisant des amorces issues de la séquence équine de référence (Wade *et al.* 2009). Parmi les polymorphismes identifiés, la délétion spécifique aux baudets c.433_434delAT est supposée être une mutation délétère car l'allèle en résultant induit une protéine tronquée à laquelle il manque sept des 12 feuillettes bêta impliqués dans la fonction de FGF5. En effet, si cet allèle est homozygote, il est associé avec le phénotype *poils longs* dans environ 90 % (31/35) des baudets de notre cohorte. Les 10 % restants des baudets à poils longs pourraient être expliqués par l'association de cette délétion c.433_434delAT avec une autre mutation récessive : c.245G >A, comme cela est le cas dans notre échantillon.

Nous avons observé un fort degré d'homologie entre la séquence de la protéine FGF5 et ses orthologues chez les mammifères, ce qui suppose que le phénotype sauvage de la protéine FGF5 est fonctionnel chez les ânes. Les ligands FGF accomplissent leurs diverses fonctions en se liant aux récepteurs FGF (FGFR) et en les activant ; ces FGFR appartiennent à la famille des récepteurs tyrosine kinase, de manière dépendante de l'héparane sulfate glycosaminoglycanes (HSGAG). Le ligand, en se liant à son récepteur et au HSGAG induit l'activation de la tyrosine kinase et une cascade de réactions intracellulaires.

Il faut noter que les 12 feuilletts bêta et les résidus critiques impliqués dans la liaison de FGF5 avec HSGAG et dans l'interaction avec FGFR sont conservés chez les chevaux et les ânes, ce qui suggère que la protéine sauvage FGF5 est fonctionnelle chez les deux espèces.

En revanche, d'après les simulations, les deux allèles mutants c.245G >A et c.433_434delAT produisent des protéines FGF5 tronquées auxquelles il manque respectivement tous les feuilletts bêta ou les sept derniers. Même si elles sont correctement adressées dans les cellules et sécrétées, il est peu probable que ces protéines encodées puissent jouer leur rôle correctement. Ces résultats sont en accord avec les phénotypes *poils longs* déjà observés chez la souris, le chien et le chat mutants pour FGF5 (Hébert *et al.* 1994 ; Sundberg *et al.* 1997 ; Housley & Venta, 2006 ; Kehler *et al.* 2007 ; Drögemüller *et al.* 2007 Mizuno *et al.* 2011 ; Dierks *et al.* 2013).

Phénotype *non pangaré*

La robe de nombreux animaux sauvages se caractérise par un pelage dit *Agouti*, qui correspond à un poil avec deux bandes d'eumélanine noire encadrant une bande de phéomélanine jaune. Le passage de la production d'un pigment à l'autre dans les mélanocytes, appelé *switch*, est sous contrôle du récepteur de 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 (Jackson *et al.* 1994; Lu *et al.* 1994). 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).

Chez le cheval, la couleur noire est récessive, la transmission du phénotype suggère 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 la 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 est 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).

En ce qui concerne le gène ASIP chez les ânes, l'ensemble des résultats obtenus suggère fortement que la cystéine en position 117 a un rôle essentiel dans la fonction de la protéine ASIP ; l'association de la mutation avec le phénotype *non pangaré* et la forte probabilité que la substitution en résultant puisse mener à une perte de fonction de la protéine mutée, soutiennent la possibilité que cette mutation soit responsable du phénotype *non pangaré* chez les ânes.

CONCLUSION

Nos résultats mettent en évidence une nouvelle mutation dans FGF5 à l'origine du phénotype *poils longs* observé chez les ânes, enrichissant ainsi la liste des animaux chez qui une mutation perte de fonction à ce locus est associée à un poil long ou angora. L'identification de cette mutation permettra aux éleveurs de détecter les porteurs hétérozygotes tant chez les races à poils courts que chez les Baudets, et d'organiser des accouplements raisonnés.

Notre travail montre également une association entre la substitution c.349 T>C dans ASIP, qui produit une substitution d'une cystéine en arginine en position 117 de la protéine, et le phénotype *non pangaré*. Nous supposons que cette mutation provoque une perte de fonction. D'autres travaux sont nécessaires pour essayer d'en expliquer le mécanisme.

BIBLIOGRAPHIE

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7: 248–9.
- Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lundeberg J. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochim.* 2000; 280:103–10.
- Beenken A & Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8: 235–53. 10.1038/nrd2792.
- Beja-Pereira A, England PR, Ferrand N, Jordan S, Bakhiet AO, Abdalla MA *et al.* African origins of the domestic donkey. *Science* 2004; 304: 1781.
- Bultman SJ, Klebig ML, Michaud EJ, Sweet HO, Davisson MT, Woychik RP. 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.* 1994; 8: 481–90.
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 1992;71:1195–1204.
- Dierks C, Mömke S, Philipp U, Distl O. Allelic heterogeneity of FGF5 mutations causes the long-hair phenotype in dogs. *Anim Genet.* 2013; 44: 425–31. 10.1111/age.12010.
- Drögemüller C, Rüfenacht S, Wichert B, Leeb T. Mutations within the FGF5 gene are associated with hair length in cats. *Anim Genet.* 2007; 38: 218–21. 10.1111/j.1365-2052.2007.01590.x.
- Drögemüller C, Philipp U, Haase B, Günzel-Apel AR, Leeb T. 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* 2007; 98: 468–73.
- Fontanesi L, Forestier L, Allain D, Scotti E, Beretti F, Deretz-Picoulet S *et al.* 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* 2010; 95: 166–75.
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 1994; 78: 1017–25. 10.1016/0092-8674(94)90276-3.
- Housley DJ & Venta PJ. The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine “hair”-itability. *Animal Genetics* 2006; 37: 309–15. 10.1111/j.1365-2052.2006.01448.x.
- Jackson IJ, Budd P, Horn JM, Johnson R, Raymond S, Steel K. 1994. Genetics and molecular biology of mouse pigmentation. *Pigment Cell Res.* 7, 73–80.
- Kehler JS, David VA, Schäffer AA, Bajema K, Eizirik E, Ryugo DK *et al.* Four independent mutations in the feline fibroblast growth factor 5 gene determine the long-haired phenotype in domestic cats. *J Hered.* 2007, 98: 555–66. 10.1093/jhered/esm072.
- Kerns JA, Newton J, Berryere TG, Rubin EM, Cheng JF, Schmutz SM *et al.* Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome* 2004; 15: 798–808.
- Kimura B, Marshall FB, Chen S, Rosenbom S, Moehlman PD, Tuross N *et al.* Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proc Biol Sci.* 2011; 278: 50–7.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, *et al.* Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 1994; 371:799–802
- Matsunaga N, Virador V, Santis C, Vieira WD, Furumura M, Matsunaga J *et al.* In situ localization of agouti signal protein in murine skin using immunohistochemistry with an ASP-specific antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;270, 176–82.
- Mizuno S, Iijima S, Okano T, Kajiwara N, Kunita S, Sugiyama F *et al.* Retrotransposon-mediated Fgf5(go-Utr) mutant mice with long pelage hair. *Exp Anim.* 2011; 60: 161–7. 10.1538/expanim.60.161.
- Perry WL, Nakamura T, Swing DA, Secret L, Eagleson B, Hustad CM *et al.* Coupled site-directed mutagenesis/transgenesis identifies important functional domains of the mouse agouti protein. *Genetics* 1996;144:255–64.
- Rieder S, Taourit S, Mariat D, Langlois B, Guérin G. 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* 2001; 12: 450–5.
- Rosenquist TA & Martin GR. 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* 1996; 205: 379–86.
- Sundberg JP, Rourk MH, Boggess D, Hogan ME, Sundberg BA, Bertolino AP. Angora mouse mutation: altered hair cycle, follicular dystrophy, phenotypic maintenance of skin grafts, and changes in keratin expression. *Vet Pathol.* 1997; 34: 171–9. 10.1177/030098589703400301.
- Suzuki S, Ota Y, Ozawa K, Imamura T. Dual-Mode Regulation of Hair Growth Cycle by Two Fgf-5 Gene Products. *J Investig Dermatol.* 2000;114: 456–63.
- Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Inslan F *et al.* Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 2009;326: 865–7. 10.1126/science.1178158.