



41^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 12 mars 2015

Caractérisation de l'hypoallergénie du cheval Curly et analyse du lien avec la frisure

Par

C. Morgenthaler¹, M. Gilles¹, E. G. Cothran², E. Barrey^{1,4}, L. Schibler^{1,3}

¹ INRA GABI UMR 1313, F-78350 Jouy en Josas

² Department of Veterinary Biosciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843 USA

³ UNCEIA, 149 rue de Bercy, F-75012 Paris

⁴ UBIAE-INSERM U902, F-91025 Evry Cedex

Résumé

Les chevaux américains de race Curly sont des chevaux frisés décrits comme hypoallergéniques ou, a minima, favorisant une certaine désensibilisation. L'étude menée avait pour objectif de mettre en place un outil qualitatif et quantitatif d'évaluation objective de l'allergénicité de ces chevaux, permettant de caractériser le lien entre l'hypoallergénicité des chevaux Curly et la frisure. L'analyse du profil antigénique de plusieurs sérums de patients présentant différents niveaux d'allergie au cheval suggère que l'hypoallergénicité des chevaux Curly serait sans rapport avec une composition protéique particulière des squames de ces chevaux.

Nous avons également souhaité identifier le gène dominant responsable de la frisure chez les chevaux Curly, en combinant analyse d'association au sein de familles et séquençage complet du génome de deux individus Curly, l'un frisé et l'autre non (straight). Une mutation faux sens G>A dans le gène de la kératine 25 a été identifiée et associée à la frisure chez la quasi-totalité de nos chevaux Curly. Toutefois, des individus frisés appartenant à une « famille discordante » ne présentent pas cette mutation, suggérant une hétérogénéité génétique. Le séquençage complet du génome de ces individus est en cours pour identifier le gène et la mutation en cause.

Mots clés : Hypoallergénie, Frisure, Kératine

Summary

American Curly horses are curly coated horses mostly described as hypoallergenic or providing at least a sort of desensitization. The main goal of this study was to establish a quantitative and qualitative tool in order to evaluate horses allergenicity allowing to characterize the link between hypoallergenicity and curly coated horses. Analysis of the antigenic profile of several patients' sera with different levels of horse allergy suggests that hypoallergenicity of Curly horses is not related to a specific protein composition of horses dander.

We also wanted to identify the dominant gene responsible for the curly coat in Curly horses, through the combination of association analysis in families and full genome sequencing of two Curly horses, one with curly coat and the other with straight hair. A missense mutation G>A in the gene Krt25 encoding a keratin have been identified and linked to curly coat in almost all Curly horses. However, a small proportion of the Curly horses, belonging to a « discordant family », do not have this mutation, suggesting a genetic heterogeneity. The full genome sequencing of these individuals is currently in progress to identify the gene and the mutation involved.

Key-words: Hypoallergeny, Curly, Keratin



Introduction

Les chevaux américains Curly connaissent un engouement aux États-Unis ainsi que dans divers pays d'Europe. Cela s'explique en partie par le fait que ces chevaux frisés sont hypoallergéniques ou semblent au moins favoriser une certaine désensibilisation (Felix *et al.*, 1996). L'hypothèse d'un lien entre hypoallergie et frisure est souvent évoquée (moindre dissémination des squames). Or, les chevaux Curly présentent une grande variabilité de frisure (allant de poils raides : straight, à des poils très frisés : curly). Cette diversité pourrait s'expliquer, selon l'hypothèse défendue par l'International Curly Horse Organization (ICHO, registre américain de référence), par les différentes combinaisons alléliques de deux gènes codant pour la frisure, l'un dominant, et l'autre récessif.

Nous avons initié cette étude, avec un double objectif : mieux caractériser l'hypoallergénicité des chevaux Curly et identifier le gène dominant responsable de la frisure.

1. Matériel et méthodes

1.1. Analyse de l'allergénicité d'un panel d'animaux

1.1.1. Sérothèque de patients

Les sérums d'une dizaine de patients ont été sélectionnés sur la base d'un questionnaire et d'un examen clinique (manifestations cliniques objectives : test cutané positif, test ImmunoCAP cheval >0,70 kun). Les patients recrutés étaient naïfs en termes de désensibilisation. Les sérums de patients fortement allergiques, utilisés comme témoins positifs, ont été fournis par la société ALK.

1.1.2. Préparation d'une banque d'allergènes

Les squames de 39 chevaux d'élevage français ont été prélevés par aspiration (aspirateur domestique, équipé d'un embout porte filtre). Au total, dix chevaux selle français (Témoins) et 29 chevaux de race Curly, regroupés en 2 groupes de frisures (21 Curly frisés, 8 Curly straight) ont été analysés. Les filtres (DUSTREAM Filtres : DU-FL-1, INDOOR biotechnologies) contenant les squames, poils et poussières ont été congelés immédiatement.

1.1.3. Comparaison des profils protéiques des squames et étude du sérum des patients

Les protéines totales ont été extraites à partir des squames dans un tampon Laemmli. L'analyse en SDS-Page des protéines a été réalisée en utilisant un gel d'acrylamide (20%) coloré au Bleu de Coomassie (résultats non présentés). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane puis mises en présence des sérums des patients. La membrane a ensuite été révélée au NBT-BCIP (révélation colorimétrique à la phosphatase alcaline).

1.2. Cartographie du gène Curly dominant

1.2.1. Génotypage

Le génotypage (puce Illumina EQUINESNP50) de 69 animaux d'élevages français et américains (51 Curly et 18 Straight) a été réalisé afin d'effectuer une étude d'association pangénomique (GWAS). L'étude GWAS, en comparant le génotype des individus Curly et Straight, a pour but de déterminer une association de certains polymorphismes avec le phénotype frisure et d'identifier un intervalle de localisation du gène responsable de la frisure.

1.2.2. Séquençage génome entier et identification de la mutation causale

Pour identifier les mutations causales, le séquençage du génome entier d'un cheval frisé (C) et d'un cheval straight (S) a été réalisé par la plate-forme PlaGe à Toulouse (HiSeq2000). Seuls les polymorphismes situés dans l'intervalle de localisation (hétérozygotes chez l'animal frisé, absents chez l'animal straight) et touchant une séquence codante ont été sélectionnés. L'impact potentiel de ces polymorphismes sur les protéines a été évalué à l'aide des logiciels de prédiction SIFT et Polyphen. Les polymorphismes candidats ont été analysés par séquençage Sanger de l'ensemble des 69 individus. Les séquences ont été analysées avec le logiciel NovoSNP (Weckx *et al.*, 2005).

2. Résultats et discussion

2.1. Caractérisation de l'hypoallergénicité des chevaux Curly

Les profils antigéniques des squames des différents types de chevaux observés se sont avérés très différents selon les patients, hormis la présence systématique d'EqC1 (allergène dominant dans les réactions allergiques au cheval). Cela démontre que divers antigènes sont responsables de l'allergénicité du cheval et que nous disposons d'un panel de patients hétérogènes, bien que positifs au test ImmunoCap (données non présentées).

Pour un même patient, nous n'avons pas observé de différences majeures de profils entre chevaux frisés et straight, ni entre Curly et Selle Français, que ce soit en termes de protéines présentes ou en termes de quantités de protéines (figure I). Il semblerait donc que l'hypoallergénicité des chevaux Curly ne soit pas en lien avec une composition protéique différente des squames. La structure du poil pourrait expliquer un moindre relargage dans l'environnement, réduisant ainsi la concentration en allergènes. Nous ne pouvons pas exclure à ce stade un biais de recrutement des patients dans la mesure où ils ont été identifiés sur la base de prick-tests positifs et sont donc sensibilisés aux antigènes majeurs. D'autres patients pourraient présenter une sensibilité à des antigènes variable entre Curly et d'autres races de chevaux.

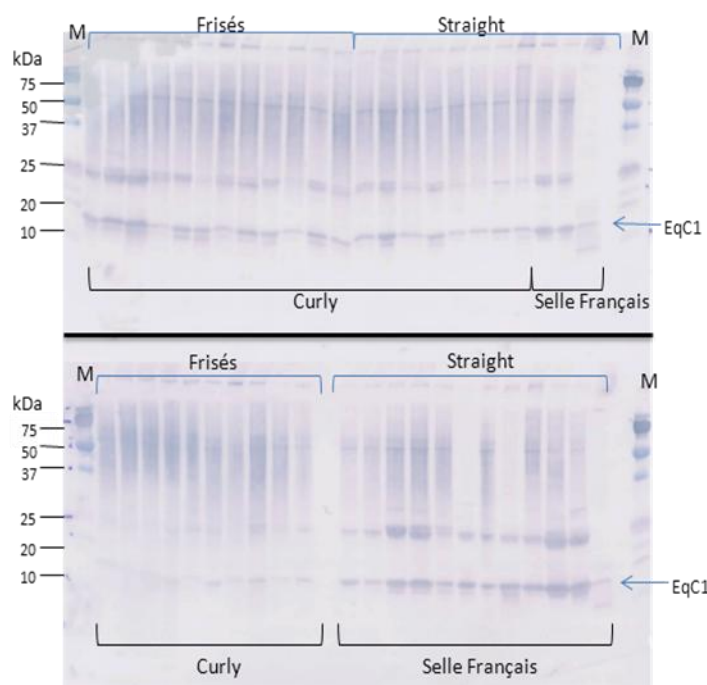


Figure I : Analyse en SDS-Page de protéines issues de squames en présence du sérum d'un patient dilué au 1/10^e. Les protéines sont séparées sur un gel à 20%, puis mises en présence du sérum d'un patient dilué au 1/10^e et révélées par NBT-BCIP

Figure I: SDS-Page analysis of dander in presence of a patient serum diluted to 1/10^e. Proteins are separated on a 20% gel, then tested with a patient serum diluted to 1/10^e and revealed with NBT-BCIP

2.2. Identification du Gène Curly dominant

L'étude d'association (GWAS) a fait apparaître un seul signal fort sur le chromosome 11 à proximité d'un cluster de gènes de kératine de type I. Pour identifier les mutations causales, le génome d'un cheval frisé hétérozygote et d'un de ses fils straight ont été séquencés.

Dans cette région d'intérêt, 462 polymorphismes ont été identifiés, pour lesquels le cheval frisé était hétérozygote alors que le cheval straight était homozygote sauvage, dont cinq mutations non-synonymes touchant la séquence codante de différents gènes. Ces mutations ont été génotypées par séquençage sur un groupe de 20 chevaux (8 chevaux frisés et 12 chevaux straight), permettant de ne retenir qu'une seule mutation candidate faux-sens G>A dans le gène Kératine 25. Un électrophorégramme de séquençage est représenté sur la Figure II. Cette mutation est décrite comme délétère par les logiciels de prédiction SIFT (sift.jcvi.org) et Polyphen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2).

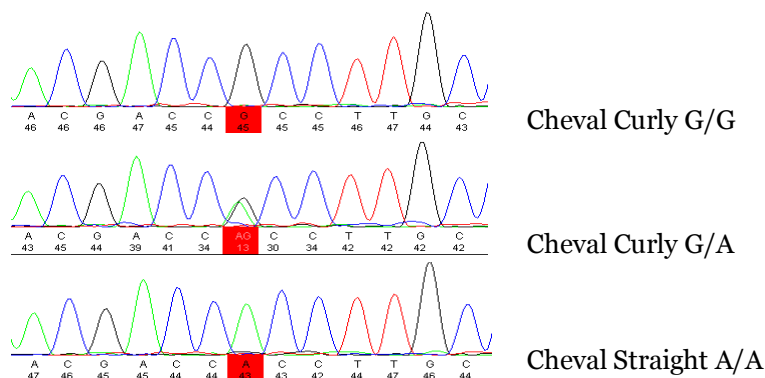


Figure II : Chromatogrammes de séquençage Sanger confirmant l'identification d'une mutation causale depuis les données de séquençage de génome entier.

Figure II: Sanger sequencing chromatograms confirming the existence of a causative mutation identified from the WGS sequencing data.

Ce résultat a été confirmé par génotypage de tous les animaux de cette étude, montrant une bonne correspondance génotype-phénotype. Toutefois, sept individus frisés appartenant à une même famille « discordante » ne présentent pas cette mutation, suggérant une hétérogénéité génétique. Cette hypothèse est en accord avec les études menées aux USA par l'ICHO, suggérant l'existence d'au moins 2 loci déterminant la frisure, l'un dominant et l'autre récessif. Le nombre réduit des individus de cette famille « discordante » ne permet cependant pas d'analyser le déterminisme génétique, ni d'effectuer une cartographie génétique. Le séquençage complet du génome de 2 de ces individus est en cours, afin de tenter d'identifier le gène et la mutation en cause.

Conclusion

Une étude détaillée des caractères spécifiques du cheval Curly (l'hypoallergénie et la frisure) revêt plusieurs intérêts :

- Au plan commercial et marketing, être capable d'évaluer le degré d'hypoallergénicité d'un cheval afin de fournir des garanties vis-à-vis de l'acheteur
- Au plan de la gestion de la population, si frisure et hypoallergénie ne sont pas liées, être capable d'identifier précocement les chevaux ayant conservé toutes les qualités de frisure recherchées par les éleveurs (à conserver comme reproducteurs).

Nos premières analyses ne permettent pas de conclure formellement quant à l'hypoallergénie et d'autres travaux seront nécessaires pour mettre en évidence les mécanismes sous-jacents. L'identification d'une mutation de transmission dominante responsable de la frisure permet d'envisager la mise au point d'un test génétique permettant l'identification d'étalons homozygotes et une meilleure gestion des accouplements.

Remerciements

Cette étude a été financée par l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation. Les auteurs remercient Louis Philippe Guillemot, Alain Thillay, Jeroen Verschuren, ainsi que l'association Oncurls et l'élevage Jak Curly pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide aux prélèvements.

Les auteurs remercient aussi Virginie Leduc, ALK, pour son aide et ses informations précieuses dans le domaine de l'allergologie.

Références

- Felix K., Ferrandiz R., Einarsson R., Dreborg MD. 1996. Allergens of horse dander : Comparaison among breeds and individual animals by immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98(1): 169-171
- Weckx S., Del-Favero J., Rademakers R., Claes L., Cruts M., De Jonghe P., Van Broeckhoven C., De Rijk P. novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. 2005. *Genome Research* 15 : 436-442