



26 février 2003

LES HARAS NATIONAUX

## Les bases génétiques de la couleur crème aux yeux bleus chez le cheval

Par : D. Mariat, S. Taourit, G. Guérin  
 INRA Centre de Recherche de Jouy  
 Laboratoire de Génétique biochimique et de cytogénétique  
 Département de Génétique animale  
 78352 Jouy-en-Josas

### Résumé

Les couleurs de base chez le cheval, comme le bai ou l'alezan, peuvent être partiellement diluées pour donner les couleurs isabelle et palomino ou complètement diluées pour donner la couleur crème, proche du blanc avec la peau rose et les yeux bleus. Cet effet de dilution est probablement régi par un seul gène, et nous avons adopté les stratégies du gène candidat et du clonage positionnel pour identifier cette « mutation crème ». Un échantillonnage de familles de chevaux a été constitué et typé pour différents marqueurs, au sein ou dans l'entourage de 2 principaux gènes candidats. Les données obtenues suggèrent que la mutation causale, une substitution de G par A, est localisée dans l'exon 2 du gène *MATP*, substituant un acide aspartique par une asparagine dans la protéine codée. Ce résultat permet la mise au point d'un test moléculaire pour identifier les individus porteurs de l'allèle crème, notamment lorsque son effet est masqué, et de faciliter ainsi la gestion des croisements.

**Mots-clés :** Cheval, couleur de robe, crème, underwhite, MATP

### Summary

In horses, basic colours such as bay or chestnut may be partially diluted to buckskin and palomino, or extremely diluted to cream, a nearly white colour with pink skin and blue eyes. This dilution is expected to be controlled by one gene and we used both candidate gene and positional cloning strategies to identify the "cream mutation". A horse panel including reference colours was established and typed for different markers within or in the neighbourhood of two main candidate genes. Our data suggest that the causal mutation, a G to A transition, is localized in the exon 2 of the *MATP* gene leading to an aspartic acid to asparagine substitution in the encoded protein. This result provides a useful molecular test for the identification of horse carriers of the cream allele, especially when its effect is not apparent, and thus improve breeding management.

**Key-words :** Horse, coat colour, cream, underwhite, MATP

La couleur de robe du cheval est un paramètre important pour l'élevage puisqu'elle intervient sur ses qualités esthétiques, sur le niveau d'acquisition de certains standards de races, et peut être même sur certaines caractéristiques comportementales. Ne dit-on pas qu'un cheval à la robe foncée sera plus vigoureux qu'un cheval à la robe plus claire ?

Ainsi la couleur de robe joue un grand rôle dans l'élevage équin, avec des répercussions économiques directes déterminant souvent la valeur d'un cheval.

De plus, les robes se caractérisent par une grande diversité, tant au niveau des couleurs qu'au niveau des nuances, rendant de ce fait l'identification délicate, même pour un œil averti. Cette diversité est le résultat de l'action de plus d'une dizaine de facteurs biologiques indépendants, qui autorisent par conséquent toutes les combinaisons possibles entre eux.

Il apparaît donc comme important de mieux décrire ces couleurs pour une description plus précise des chevaux lors de leur inscription dans les registres et faciliter ainsi le choix des croisements.

### **L'OBJECTIF DE L'ETUDE ET SES ACTEURS**

L'Association française du Poney Connemara et le Laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique de l'INRA de Jouy-en-Josas collaborent depuis 3 ans en vue de caractériser les bases génétiques de la couleur crème chez le Poney.

L'objectif de notre travail est d'identifier le gène crème chez le Cheval, et de mettre au point un test génétique capable de détecter les chevaux porteurs d'une seule copie du gène, afin de déterminer les individus susceptibles de transmettre cette copie à leur descendance. Bien évidemment ce test trouverait toute son utilité dans le cas de chevaux autres que palomino ou isabelle, comme par exemple le gris qui est répandu chez le Poney du Connemara.

De ce point de vue, l'Association française du Poney Connemara (AFPC) présente un exemple significatif. En effet les standards de la race excluent jusqu'à aujourd'hui, la couleur crème aux yeux bleus, qui se traduit pourtant par une apparition relativement fréquente dans les élevages de Poneys. Les éleveurs sont alors confrontés à la nécessité de limiter au mieux cette apparition notamment par une meilleure identification génétique des reproducteurs.

Dans ce but, grâce à l'action de l'AFPC et la collaboration de nombreux éleveurs, nous avons constitué un échantillonnage de prélèvements sanguins à partir d'étalons qui ont engendré des produits crème, ainsi que de leur mère, et bien sûr des poulains crème avec leurs frères et sœurs.

Les étalons retenus jusqu'à présent dans notre étude sont au nombre de onze. Les prélèvements sanguins nous permettent d'extraire le matériel génétique de l'animal, l'ADN, et de procéder à une analyse au niveau moléculaire.

### **LES CONNAISSANCES INITIALES SUR LE CARACTERE ETUDIE**

On distingue trois couleurs de base chez le cheval ; le noir, le bai et l'alezan. L'action de la dilution de la coloration sur ces bases peut être partielle, dans ce cas le cheval a reçu une seule copie du gène crème (Cr) de ses parents, ou la dilution peut être totale, dans ce cas le cheval est porteur de 2 copies du gène Cr car il en a reçu une de chacun de ses parents. La dilution totale aboutit à la couleur crème, quelle que soit la couleur de base, et la dilution partielle aboutit à la couleur palomino, si la couleur de base est l'alezan, et la couleur isabelle, si la couleur de base est le bai (voir tableau 1). Il s'ensuit qu'un croisement ne peut générer un cheval crème que si chacun des parents est porteur du gène Cr, ou a fortiori si les parents sont crème eux-mêmes (Sponenberg 1996).

Ces observations, ainsi que son mode de transmission, indiquent que ce caractère est codominant et d'un déterminisme simple, donc probablement dû à un seul gène, non lié au sexe.

On peut noter que le gène crème n'est pas le seul gène de dilution connu, puisque l'on décrit également les effets des gènes Dun et Silver Dapple, qui peuvent aussi donner lieu à des interactions entre eux (Bowling et al 2000).

### **STRATEGIE DU GENE CANDIDAT**

Compte tenu des fonctions mises en cause dans la dilution de la couleur de robe, notamment au niveau de la synthèse des pigments, et compte tenu d'éléments tirés de la littérature dans ce domaine, nous avons tout d'abord considéré que 5 gènes étaient susceptibles d'être responsables de la couleur crème, soit la tyrosinase, la myosine 5A, la myosine 10, le locus p (pink eyed dilution) et le locus underwhite.

Pour cela, nous nous sommes inspirés des connaissances de génétique décrites chez l'Homme ou chez la Souris, où le caractère crème existe aussi, sous différentes formes.

A ce stade l'enjeu consistait donc à déterminer, parmi tous ces gènes, lequel est le plus probablement impliqué dans la couleur crème.

### **STRATEGIE DU CLONAGE POSITIONNEL**

Du fait des informations apportées par des marqueurs génétiques, nous avons pu exclure l'implication de certains de ces gènes, et déterminer, en accord avec les travaux d'une équipe américaine (Locke et al 2001), que le gène responsable était situé sur le chromosome 21 du génome équin, comme c'est le cas pour le locus underwhite et pour la myosine 10.

Ensuite, une analyse plus fine de marqueurs très proches de ces gènes, au moyen des familles de chevaux constituées où l'on examine la façon dont est transmis le gène Cr à la descendance, nous a permis, de proche en proche, de conclure que le locus underwhite, qui correspond au gène MATP (Membrane-associated transporter protein), était très probablement le gène en cause.

### **L'ETUDE CIBLEE DU GENE MATP ET MISE AU POINT D'UN TEST MOLECULAIRE**

A ce stade, une étude portant sur les régions codantes du gène *MATP*, grâce aux acides nucléiques extraits de fragments de peau de chevaux crème et bai, a révélé l'existence d'une mutation dans l'exon 2 du gène correspondant au nucléotide 72, où un résidu Asp est remplacé par un résidu Asn dans le cas d'une robe diluée, ce qui correspond à la substitution d'un seul nucléotide G par un A (C par un T en séquence complémentaire) (Mariat et al 2003).

Il est remarquable de constater que cette même mutation est également décrite chez l'Homme et chez la Souris.

Le test moléculaire qui découle de ce résultat repose sur l'amplification par PCR d'une partie de l'exon 2 du gène *MATP* et de son séquençage direct pour déterminer la nature du nucléotide en position 72. Cette opération constitue désormais un acte de laboratoire classique, donc facilement réalisable. D'autres méthodes de détection sont également disponibles.

Trois cas de figure sont donc envisageables, selon que l'animal est non-porteur, porteur hétérozygote, ou porteur homozygote de cette mutation, comme indiqué dans la figure 1, sur les exemples de séquences reverses de l'exon 2, autour de la mutation en cause. On observera que dans le cas d'un animal hétérozygote il y a superposition de 2 pics, ce qui correspond à la présence simultanée de 2 nucléotides, notée « N » dans la séquence.

## CONCLUSION

Il faut souligner que le développement des biotechnologies que l'on connaît dans le domaine de la génétique humaine rejaillit directement sur la menée de nos travaux, et que le fait de pouvoir transposer les découvertes faites chez l'Homme à une application chez le Cheval grâce à la cartographie comparative, nous a permis également d'orienter significativement nos études.

Cependant, il demeure un apport fondamental et qui ne peut pas être remplacé ; il s'agit des prélèvements de sang ou de peau, qui sont une ressource indispensable, et que nous avons pu effectuer notamment grâce à une collaboration fructueuse avec les membres de l'AFPC.

Nous disposons donc actuellement d'un test génétique qui permet d'identifier au niveau moléculaire si un individu est porteur ou non du caractère crème. Cet outil trouve, entre autre, son utilité dans le cas de phénomènes épistatiques, où une couleur en masque une autre, comme c'est le cas pour les caractères gris ou noir qui n'expriment pas de dilution de robe dans le cas d'individus porteurs d'une seule copie du gène muté. Ainsi, les éleveurs et les institutions impliquées dans la gestion des élevages et des races, ont désormais la possibilité de détecter les chevaux porteurs de la mutation, et de mieux gérer les croisements afin de mieux contrôler la génération de produits crème.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été en partie financé par les Haras Nationaux. Il a également bénéficié de l'action de l'Association française du Poney Connemara et de ses adhérents, ainsi que de l'intervention et des conseils de St. Chaffaux et de B. Langlois (INRA, Département de Génétique animale).

## BIBLIOGRAPHIE

- Bowling A.T., Ruvinsky A., The genetics of the horse, CABI publishing 2000  
 Locke M.M., Ruth L.S., Millon L.V., Penedo M.C.T., Murray J.D., Bowling A.T., The cream dilution gene, responsible for the palomino and buckskin coat colours, maps to horse chromosome 21, *Animal Genet.* 32 (2001) 340-343.  
 Mariat D, Taourit S, Guérin G, A mutation in the MATP gene causes cream coat colour in the horse, *Genetics Selection Evolution* 35: 1 (2003) sous presse  
 Sponenberg D.P., Equine color genetics, Iowa State University Press, 1996.



Tableau 1

Effets de la dilution sur les couleurs de base  
Effects of dilution on basic colours

AUCUNE DILUTION NO DILUTION	DILUTION PARTIELLE PARTIAL DILUTION	DILUTION COMPLETE COMPLETE DILUTION
Couleurs de base Basic colours C <sup>+</sup> C	C <sup>+</sup> C <sup>cr</sup>	C <sup>cr</sup> C <sup>cr</sup>
Noir Black	Noir	Crème Smocky cream
Bai Bay	Isabelle Buckskin	Crème Perlino
Alezan Chesnut	Palomino	Crème Cremello