

Test de génotypage du caractère frisé chez le cheval Curly

Sophie Dhorne-Pollet ¹ ; Caroline Morgenthaler ¹ ; Alexia Debus ² ; Céline Robert ^{1,2} et Eric Barrey ¹

¹ Unité Mixte de Recherche 1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative ; Institut National de la Recherche Agronomique, AgroParisTech, Université Paris Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

² Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons Alfort, France

sophie.pollet@inra.fr



Ce qu'il faut retenir

La fréquence de l'allergie aux squames de cheval a doublé entre 1970 et 1990 et elle ne cesse d'augmenter depuis. Une solution potentielle pour les cavaliers serait l'utilisation de chevaux Curly. En effet, ces équidés présentent des poils frisés qui retiendraient mieux les squames à leur surface. Bien qu'aucune étude ne l'ait encore démontré, cette particularité du poil donne aux chevaux Curly la réputation d'être hypoallergéniques.

L'exploitation des chevaux Curly en Europe par croisement avec d'autres races fait courir le risque de réduire progressivement la fréquence du phénotype frisé, voire de le perdre à moyen terme.

Nous avons identifié une mutation responsable de ce phénotype frisé par une étude d'association génétique et un reséquençage de génomes de chevaux Curly. Cette mutation est ponctuelle et de type *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), avec une transmission autosomique dominante.

Pour aider les éleveurs à gérer au mieux ce caractère frisé du cheval Curly, nous avons exploité nos résultats et mis au point un test de génotypage permettant d'identifier les animaux porteurs de cette mutation. L'utilisation de ces animaux comme reproducteurs permettra le maintien du phénotype frisé.

1 Contexte et objectifs

L'allergie aux poils, ou plus exactement aux squames de cheval, est en constante augmentation. Sa fréquence a doublé entre 1970 et 1990, passant de 5% à 10 % chez les patients présentant une prédisposition familiale aux allergies. Depuis elle ne cesse d'augmenter parallèlement au développement de la pratique de l'équitation (1). Si cette allergie ne concerne qu'une minorité de la population générale, à savoir 2,7 % en France, elle peut atteindre 6 à 7,6 % en Suède (2 ; 3). Cette allergie constitue donc un problème de santé publique pour les cavaliers et les professionnels de la filière.

L'allergie aux squames est une réaction d'hypersensibilité immédiate qui se manifeste par des symptômes souvent intenses. Parmi les plus fréquents, la conjonctivite, l'asthme et les rhinites allergiques touchent respectivement 75 %, 54% et 40% des patients (1 ; 4). Les autres signes cliniques moins fréquents sont l'urticaire, l'œdème et dans de rares cas le choc *anaphylactique*.

Le traitement des patients par prise d'anti-histaminiques est contraignant et la désensibilisation spécifique s'avère peu efficace. Seule l'éviction est généralement recommandée par les allergologues. Cette dernière, bien qu'étant une mesure rationnelle, n'est évidemment pas sans conséquence psychologique chez les enfants et les cavaliers passionnés. Les acteurs de la filière (vétérinaires, jockeys, lads ...) peuvent développer une maladie professionnelle, voire une invalidité nécessitant une réorientation professionnelle. Chez certaines

personnes allergiques, les crises peuvent survenir même en l'absence de contact direct avec un équidé, mais simplement en contact avec les allergènes présents dans l'environnement, au voisinage d'une écurie ou sur les vêtements d'un cavalier.

Les allergènes responsables de l'allergie au cheval sont principalement localisés au niveau des poils, de la salive et de l'urine. Plus de 16 allergènes réagissant avec le sérum de patients sensibilisés ont été mis en évidence (5).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au cheval de race Curly. Ce cheval de selle est originaire des Etats-Unis et a la particularité, en plus d'être polyvalent et d'avoir le poil frisé, d'être considéré comme hypoallergénique (6). A ce jour, l'hypo-allergénicité des chevaux Curly n'a pas encore été démontrée. Les raisons de cette faible allergénicité ne sont pas encore élucidées, mais l'hypothèse d'un lien avec la frisure a été évoquée. En effet, la structure particulière du poil frisé pourrait expliquer une faible dissémination des allergènes (ici les squames) qui s'y trouveraient d'avantage retenus. Ainsi, Le cheval Curly pourrait représenter une alternative pour tous les passionnés de chevaux et cavaliers souffrant d'allergie. Il est intéressant de noter que ce caractère de frisure existe également dans d'autres espèces comme les chiens et les chats (figure I ; (7)).

Figure I : Animaux présentant le caractère de frisure. Sources: chevaux (<http://ichophotos.weebly.com>); chien (<http://de.wikipedia.org>); chat (FINTICAT cat show Helsinki 2013-11-23)



Outre cette particularité physique, le cheval Curly est également un animal polyvalent, apte à la pratique de toutes les disciplines équestres de loisir : randonnée équestre, TREC, équitation western, saut d'obstacle, dressage, endurance, et équithérapie. Néanmoins, avec un effectif mondial compris entre 4000 et 4600 chevaux en 2012 et 2013, le cheval Curly reste rare. La race s'exporte vers la France où il est reconnu depuis 2011, mais il est difficile d'estimer aujourd'hui l'effectif français. Selon les sources, il varie du simple au triple (entre 70 et 200 individus en 2013). Actuellement, l'exploitation en Europe des chevaux Curly par croisement avec d'autres races, fait courir le risque de diluer progressivement le caractère poils frisés, voire de le perdre à moyen terme.

Notre équipe a mené une étude d'association pangénomique (GWAS pour *Genome Wide Association Study*) qui nous a permis d'identifier une mutation localisée dans un gène de kératine codant une protéine très souvent associée au phénotype poil frisé (8). En effet, une association forte entre le phénotype frisé et des variants génétiques a été observée sur le chromosome 11 équin dans une région particulièrement intéressante puisqu'elle compte 36 gènes, parmi lesquels 10 gènes de kératine. Nous avons entrepris un reséquençage de génome entier pour identifier de manière exhaustive la ou les mutations causales parmi ces 36 gènes candidats. Nous avons tout d'abord identifié quatre variants génétiques, pour finir par en valider finalement un seul. L'ensemble de ces résultats nous a donc permis d'identifier une mutation responsable du phénotype frisé chez le cheval Curly. C'est une mutation ponctuelle de type *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), à mode de transmission autosomique dominante (8).

Nous avons exploité ces résultats avec l'objectif d'aider à préserver le caractère frisé dans la race Curly en mettant au point un test de génotypage rapide et fiable permettant de sélectionner les chevaux reproducteurs porteurs de la mutation identifiée.

2 Méthode

2.1 Echantillonnage

Le test de génotypage a été mis au point sur 90 chevaux Curly américain de phénotype et de génotype connu déterminé par séquençage du locus porteur du SNP d'intérêt. Le test de génotypage a ensuite été validé sur 37 chevaux Curly français de phénotype poil frisé ou raide, bien caractérisé, mais de génotype inconnu. Les ADN ont été extraits à partir de sang prélevé sur tube BD Vacutainer EDTA K2. Les extractions ont été réalisées par la plateforme @BRIDGE (INRA, UMR1313 GABI). La qualité et la concentration des ADN ont été contrôlées par spectrophotométrie (NanoDrop 2000c).

2.2 Génotypage par discrimination allélique

Le test de génotypage que nous avons développé utilise la PCR en temps réel (ou PCR quantitative : PCRq) couplée à l'utilisation de sondes d'hydrolyse. Cette méthode expérimentale permet une discrimination allélique rapide et très sûre. Par conséquent le génotypage des animaux est obtenu de manière fiable et reproductible. Nous avons optimisé notre protocole afin de diminuer la quantité d'ADN nécessaire pour génotyper les animaux. Afin de tester la sensibilité, nous avons testé quatre quantités différentes d'ADN : 20 ng, 10 ng, 5 ng et 1 ng.

3 Résultats

3.1 Mise au point du test de génotypage

La mise au point du protocole de génotypage a été réalisée à partir de 20 ng d'ADN. Cette quantité n'est pas toujours disponible, surtout pour les échantillons de crin. Les résultats obtenus montrent que quelle que soit la quantité d'ADN utilisée (entre 20 ng et 1 ng) les résultats sont identiques.

Les génotypes déterminés par discrimination allélique sur les 90 chevaux Curly américain de phénotype et de génotypes connus sont identiques à ceux obtenus par séquençage (100 % d'identité). Nous retrouvons 32,3 % de génotype hétérozygote et 67,7 % de génotype homozygote. Les proportions de chaque génotype sont présentées tableau 1.

Tableau 1 : Distribution des génotypes par rapport au phénotype chez 90 chevaux Curly américain.
W représente l'allèle « raide » et Z représente l'allèle « frisé ».

Phénotype	Génotypes			Total
	W/W	W/Z	Z/Z	
Poil frisé	14,4 %	32,3 %	8,9 %	55,6 %
Poil raide	44,4 %	0,0%	0,0%	44,4 %
Total	58,8 %	32,3 %	8,9 %	100,0 %

Nous expliquons correctement la combinaison « phénotype/génotype » pour 85,6 % des chevaux testés. En revanche, dans 14,4 % des cas, le génotype n'explique pas le phénotype (génotype W/W et poil frisé, tableau 1). Ceci représente 13 chevaux porteurs du génotype poil raide (W/W) mais présentant un « poil frisé ». Cette discordance entre génotype et phénotype a déjà été rapportée dans la littérature (8 ; 9). En effet un deuxième gène porteur d'une mutation ponctuelle de type *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), autosomique dominante, a été identifié et caractérisé.

3.2 Validation du test de génotypage

En ce qui concerne les 37 chevaux Curly français de phénotype connu mais de génotype inconnu, tous les génotypes déterminés par discrimination allélique sont cohérents avec les phénotypes observés. Toutefois comme pour les chevaux Curly américains, nous avons identifié une faible proportion de discordances portant sur 10,8 % des chevaux testés. Les proportions de chaque génotype sont présentées tableau 2. Tous les individus présentant un poil frisé sont porteurs du SNP correspondant (allèle frisé) soit à l'état hétérozygote (73,3 % des chevaux testés), soit à l'état homozygote (13,5 % des chevaux testés).

Tableau 2 : Distribution des génotypes par rapport au phénotype chez 37 chevaux Curly français.
W représente l'allèle « raide » et Z représente l'allèle « frisé ».

Phénotypes	Génotypes			Total
	W/W	W/Z	Z/Z	
Poil frisé	10,8 %	73,0 %	13,5 %	97,3 %
Poil raide	2,7 %	0.0 %	0.0 %	2,7 %
Total	13,5 %	73,3 %	13,5 %	100,0 %

Si on compare les populations des chevaux Curly américains et français que nous avons génotypées au laboratoire, 97,3 % des chevaux Curly français sont frisés contre seulement 55,6 % pour les chevaux américains.

La proportion de chevaux de génotype discordant est de 10,8 % pour les chevaux français contre 14,4 % pour les américains. Ces génotypes discordants ne remettent pas en question les résultats et la fiabilité de notre test de génotypage. En effet, notre test permet d'identifier les chevaux porteurs du SNP d'intérêt, à l'état homozygote ou hétérozygote, avec un taux d'erreur de 0,0%. Nous présentons dans le tableau 3 la

distribution des phénotypes en fonction du génotype des parents pour aider les éleveurs à conserver le caractère poil frisé.

Tableau 3 : Distribution des phénotypes poil frisé / raide en fonction du génotype des parents

		Génotypes du père		
		W/W	W/Z	Z/Z
Génotypes de la mère	W/W	90 % raide/10 % frisé	50 % raide/50 % frisé	100 % frisé
	W/Z	50 % raide/50 % frisé	25 % raide/75% frisé	100 % frisé
	Z/Z	100 % frisé	100 % frisé	100 % frisé

Nous émettons une réserve concernant le croisement entre animaux homozygote Z/Z, c'est à dire porteur de deux copies du SNP conférant le phénotype frisé. En effet, il a été décrit dans la littérature que cette même mutation est responsable d'une pilosité réduite (hypotrichose). Ce type de croisement serait donc à éviter.

4 Applications pratiques

Ce test de génotypage par discrimination allélique utilisant la PCR quantitative couplée à l'utilisation de sonde d'hydrolyse permet :

- i) de génotyper rapidement et à grande échelle la population des chevaux Curly ;
- ii) d'identifier les chevaux reproducteurs porteur de la mutation identifiée responsable du caractère poil frisé ;
- iii) de mettre en place des accouplements raisonnés entre chevaux Curly ;
- iv) de préserver le caractère poil frisé du cheval Curly.

5 Perspectives

Le test de génotypage que nous avons développé au laboratoire sera très prochainement disponible auprès du laboratoire LABÉO Frank Duncombe.

Bien qu'une deuxième mutation ait été identifiée et caractérisée, celle-ci n'explique pas les cas discordant que nous avons identifiés chez les chevaux Curly français (9). Nous n'avons pas retrouvé cette mutation après séquençage des échantillons d'ADN. C'est pourquoi nous travaillons actuellement sur la recherche d'une autre mutation qui expliquerait les 10,8 % de cas discordants. Lorsque ce gène sera caractérisé, nous pourrons être en mesure de proposer un test de génotypage complémentaire permettant d'expliquer tous les phénotypes poils frisés.

6 Bibliographie

- 1- Lelong et al. Rev Fr Allergol 1992; 32(4):216
- 2- Novembre et al. J Invest Allergol Clin Immunol 2009; 19(3):247-9
- 3- Warm et al. J Allergy Clin Immunol. 2015 Dec; 136(6):1559-65.
- 4- Vervloet et al. Traité d'Allergologie. Paris: Flammarion, Médecine-Sciences, 2003: 481-7
- 5- Bulone et al. Int Arch Allergy Immunol 2000; 123(3):220-7
- 6- Mitlehner et al. Pneumologie. 2015 Dec; 69(12):711-18.
- 7- Zahradnik et al. PLoS One. 2018 Dec 12; 13(12): e0207871
- 8- Morgenthaler et al. Genet Sel Evol. 2017 Nov 15; 49(1):85
- 9- Thomer et al. Sci Rep. 2018 Apr 23; 8(1): 6374