

Année 2013



**CARACTÉRISATION DU PHÉNOTYPE  
« YEUX BLEUS » CHEZ LE BEAGLE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le 19 Décembre 2013

par

**Tatiana, Lucile, Cynthia SEIGNEURET**

Née le 28 mai 1988 à Paris 12<sup>ème</sup>

JURY

**Président : Pr.  
Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

**Membres**

**Directeur : Dr Marie ABITBOL**

**Maître de Conférences à l'ENVA**

**Assesseur : Dr Sabine CHAHORY**

**Maître de Conférences à l'ENVA**

**Invitée : Dr Karine REYNAUD**

**Chargée de recherches INRA**



## LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : COTARD Jean-Pierre, MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires : Mme et MM. : BENET Jean-Jacques, BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard,

CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques

### **DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)**

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<b>UNITE DE CARDIOLOGIE</b>	<b>DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b>
- Mme CHETBOUL Valérie, Professeur *	- M. PARAGON Bernard, Professeur
- Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier	<b>DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b>
<b>UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b>	- Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences
- M. AUDIGIE Fabrice, Professeur	<b>UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b>
- M. DENOIX Jean-Marie, Professeur	- M. BENSIGNOR Emmanuel, Professeur contractuel
- Mme DUMAS Isabelle, Maître de conférences contractuel	- M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP)
- Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier *	- M. CHERMETTE René, Professeur *
- M. LECHARTIER Antoine, Maître de conférences contractuel	- M. GUILLOT Jacques, Professeur
- Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Praticien hospitalier	- Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences
- Mme TRACHSEL Dagmar, Maître de conférences contractuel	- M. POLACK Bruno, Maître de conférences
<b>UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b>	<b>UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b>
- Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel	- M. FAYOLLE Pascal, Professeur
- Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier	- M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences
<b>UNITE DE MEDECINE</b>	- M. MOISSONNIER Pierre, Professeur*
- Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel	- M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel
- M. BLOT Stéphane, Professeur*	- Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP)
- Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences	- Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Professeur
<b>UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b>	- M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences
- Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel	<b>DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b>
- M. GRANDJEAN Dominique, Professeur *	- Vacant
- Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel	

### **DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)**

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Professeur - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<b>UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b>	<b>UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b>
- M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences	- Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences
- M. BOLNOT François, Maître de conférences *	- M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)
- M. CARLIER Vincent, Professeur	- M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)
- Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences	- Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel
<b>UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b>	- M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel
- Mme DUFOUR Barbara, Professeur*	- M. NUDELmann Nicolas, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)
- Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur	- M. REMY Dominique, Maître de conférences*
- Mme PRAUD Anne, Maître de conférences	<b>UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b>
- Mme RIVIERE Julie, Maître de conférences contractuel	- M. ARNE Pascal, Maître de conférences*
<b>UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b>	- M. BOSSE Philippe, Professeur
- M. ADJOU Karim, Maître de conférences *	- M. COURREAU Jean-François, Professeur
- M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel	- Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur
- M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel	- Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences
- M. MILLEMANN Yves, Professeur	- M. PONTER Andrew, Professeur

### **DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<b>UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b>	<b>UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b>
- M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*	- Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences*
- Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur	- M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur
- M. DEGUEURCE Christophe, Professeur	- Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel
- Mme ROBERT Céline, Maître de conférences	- M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel
<b>DISCIPLINE : ANGLAIS</b>	<b>UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b>
- Mme CONAN Muriel, Professeur certifié	- M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur
<b>UNITE DE BIOCHIMIE</b>	- Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences
- M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences*	- Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur*
- M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences	<b>UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b>
<b>DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES</b>	- Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur
- M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences	- M. PERROT Sébastien, Maître de conférences
<b>DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b>	- M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*
- M. PHILIPS Pascal, Professeur certifié	<b>UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b>
<b>DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b>	- Mme COMBRISSON Hélène, Professeur
- Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences	- Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences
<b>UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b>	- M. TIRET Laurent, Maître de conférences*
- Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences	<b>UNITE DE VIROLOGIE</b>
- M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*	- M. ELOIT Marc, Professeur
	- Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *

\* responsable d'unité



# REMERCIEMENTS

**Au Président du Jury,**

*Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil.*

*Qui nous fait honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.*

*Hommage respectueux.*

**À Madame Marie Abitbol,**

*Maître de Conférences de l'École nationale vétérinaire d'Alfort.*

*Pour m'avoir guidée dans la réalisation des expériences et la rédaction.*

*Pour son aide, sa patience et sa gentillesse.*

*Remerciements chaleureux.*

**À Madame Sabine Chahory,**

*Maître de Conférences de l'École nationale vétérinaire d'Alfort.*

*Pour m'avoir aidée dans la réalisation des expériences et la rédaction.*

*Pour ses conseils et son aide.*

*Sincères remerciements.*

**À Madame Karine Reynaud,**

*Chargée de recherches INRA.*

*Pour m'avoir aidée à trouver les beagles,*

*réalisée les croisements et avoir entretenue la colonie de chiens.*

*Sincères remerciements.*

**À toute l'équipe du Service d'Ophthalmologie,**

*de l'École nationale vétérinaire d'Alfort.*

*L'Assistante, le Docteur Elise Donzel.*

*Merci pour leur aide précieuse.*

**À l'élevage Harlan.**

*Pour avoir donné des chiens à l'ENVA.*

*Merci pour leur participation à la réalisation de cette thèse.*

**À l'élevage Marshall en Italie et aux Etats-Unis.**

*Pour avoir envoyé trois chiens à l'ENVA*

*Malgré leur fort éloignement, merci.*

**À ma famille et à ma sœur Jessica.**

*Merci pour m'avoir accompagnée et soutenue sans relâche tout au long de ce travail.*

**À Julie, Fanny, Amélie et Juliette.**

*Mes amies d'études.*

*Merci pour tous ces moments passés avec vous.*

**À ma chienne Elia, et mon chat Mouchka.**

*Pour les moments de bonheur qu'ils apportent.*

**Aux Chiens beagle de l'étude.**

*Merci à tous ces chiens qui sont toujours restés très sages, même pour les fonds d'œil !*

*Sans qui mon travail n'aurait pas été possible.*

# TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	11
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	13
I. Structure et pigmentation du globe oculaire chez le chien .....	15
I.1. Structure du globe oculaire .....	15
I.1.1. La tunique fibreuse .....	16
I.1.2. La tunique vasculaire .....	16
I.1.2.1. L'iris.....	16
I.1.2.2. Le corps ciliaire.....	17
I.1.2.3. La choroïde et le tapis .....	17
I.1.3. La tunique nerveuse .....	19
I.1.3.1. L'épithélium pigmentaire.....	20
I.1.3.2. La neurorétine .....	21
I.2. Pigmentation des tissus .....	24
I.3. Spécificités de la pigmentation de l'œil.....	25
I.3.1. Distribution de la mélanine dans l'œil.....	25
I.3.2. Pigmentation de l'iris .....	25
I.3.2.1. Chez l'homme .....	26
I.3.2.2. Chez le chien.....	26
II. Examen ophtalmologique chez le chien.....	29
II.1. Examen du segment antérieur de l'oeil .....	29

II.2. Examen et aspect du fond d'œil .....	29
II.3. Electrorétinogramme .....	31
III. Anomalies oculaires d'origine héréditaire chez le beagle .....	34
IV. Recherche génétique appliquée à la couleur des yeux bleus chez le beagle	39
IV.1. Techniques génétiques utilisables pour l'identification de gènes d'intérêt .....	39
IV.1.1. Outils génétiques.....	39
IV.1.1.1. Les Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) .....	39
IV.1.1.2. La Polymerase Chain Reaction (PCR).....	39
IV.1.2. Cartographie.....	42
IV.1.2.1. Cartes génétiques .....	42
IV.1.2.2. Carte physique .....	45
IV.1.2.3. Les cartes d'hybrides d'irradiation .....	46
IV.1.2.4. Cartes cytogénétiques et cartes comparatives .....	49
IV.1.2.5. Cartes intégrées .....	53
IV.1.2.6. Le séquençage du génome du chien.....	54
IV.1.3. Stratégies d'identification de gènes chez le chien .....	55
IV.1.3.1. Clonage positionnel .....	56
IV.1.3.2. Gène candidat.....	60
IV.2. Gènes responsables de la pigmentation de l'œil chez l'homme .....	62
IV.2.1. Gène OCA2 (oculocutaneous albinism type 2) .....	62
IV.2.2. Gène HERC2 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2).....	63
IV.2.3. Autres gènes.....	63
IV.2.4. Détection de trois nouveaux locus par la recherche de QTL .....	63
IV.2.4.1. Notion de QTL .....	63
IV.2.4.2. Trois nouveaux locus .....	64

<b>DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>65</b>
I. Animaux .....	67
II. Matériel et méthode.....	70
II.1. Ophtalmologie .....	70
II.1.1. Examen ophtalmologique .....	70
II.1.2. Examen ERG .....	70
II.1.2.1. Anesthésie et préparation des animaux.....	70
II.1.2.2. Matériel et réglage du matériel .....	71
II.1.2.3. Protocole .....	71
II.1.2.4. Analyse statistique des résultats.....	71
II.2. Génétique.....	72
II.2.1. Arbres généalogiques.....	72
II.2.2. Extraction d'ADN.....	72
II.2.2.1. À partir du sang.....	72
II.2.2.2. À partir de brossettes .....	72
II.2.3. PCR .....	73
II.2.3.1. Dessin des amorces de PCR.....	73
II.2.3.2. Réaction de PCR.....	73
II.2.4. Séquençage .....	74
II.2.5. Pyroséquençage .....	74
II.2.6. Logiciels utilisés .....	75
III. Résultats .....	76
III.1. Etude ophtalmologique .....	76
III.1.1. Examen ophtalmologique .....	76
III.1.2. Examen ERG .....	81
III.2. Pelage .....	94

III.3. Génétique .....	97
III.3.1. Identification du mode de transmission .....	97
III.3.2. Recherche de gènes candidats chez le chien pour la couleur bleue des yeux	101
III.3.3. Amplification de la région sélectionnée .....	106
III.3.4. Résultats du séquençage. ....	108
III.3.5. Résultats du génotypage .....	109
IV. Discussion.....	113
IV.1. Étude ophtalmologique .....	113
IV.2. Étude génétique.....	114
CONCLUSION .....	117
BIBLIOGRAPHIE .....	119
ANNEXES .....	123

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe schématique du globe oculaire de chien.....	15
Figure 2 : Organisation de la rétine et continuité avec le corps ciliaire et l'iris.....	17
Figure 3 : Emplacement et fonction du tapis choroïdien de type cellulaire chez le chien .....	18
Figure 4 : Coupe histologique du tapis d'un chien vue sous microscope électronique .....	19
Figure 5 : Coupe schématique de fond d'œil de chien.....	20
Figure 6 : Micromouvements pigmentaires rétiniens sous l'influence de la lumière .....	21
Figure 7 : Organisation schématique de la rétine .....	23
Figure 8 : Synthèse des mélanines .....	24
Figure 9 : Coupe histologique montrant la distribution des pigments dans l'iris .....	27
Figure 10 : Coupe histologique montrant la distribution des pigments dans le corps ciliaire .	28
Figure 11 : Fond d'œil d'un beagle ayant les iris de couleur marron.....	30
Figure 12 : Emplacement des électrodes lors de l'électrorétinogramme .....	31
Figure 13 : Détermination des caractéristiques de l'onde b lors de la réponse de la rétine globale à un flash lumineux unique en ambiance scotopique (ERG du chien H2F0725).....	32
Figure 14 : Détermination des caractéristiques des ondes a et b lors de la réponse de la rétine globale à un flash lumineux unique en ambiance photopique (ERG du chien H2F0725).....	33
Figure 15 : Détermination des caractéristiques de l'onde a et b lors de la réponse de la rétine globale à plusieurs flashes lumineux, flicker. (ERG du chien H2F0725).....	33
Figure 16 : Principe de réalisation pratique d'une PCR .....	41
Figure 17 : Crossing-over lors de la méiose.....	43
Figure 18 : Liaison génétique et recombinaison .....	44
Figure 19 : Établissements d'une carte physique de fragment chevauchants à l'aide de STS.	45
Figure 20 : Séquençage des extrémités .....	46
Figure 21 : Fabrication des hybrides d'irradiation.....	47
Figure 22 : Différents clones d'hybrides obtenus .....	48
Figure 23 : Principe de l'hybridation <i>in situ</i> sur chromosomes (FISH) .....	50
Figure 24 : Résultat d'une hybridation sur des chromosomiques de chien.....	51
Figure 25 : Carte comparative entre l'homme et le chien.....	52
Figure 26 : Carte intégrée du chromosome 5 canin (CFA 5) .....	53
Figure 27 : Stratégie d'identification de gène.....	55
Figure 28 : Structure haplotypique du chien .....	57
Figure 29 : Stratégie de cartographie en deux étapes.....	59
Figure 30 : Couleur des iris du beagle HOB2628 .....	76
Figure 31 : Schéma et photos du fond d'œil du beagle HOB2628 .....	79
Figure 32 : Schéma du fond d'œil du beagle H2F1072 .....	79
Figure 33: Schémas des fonds d'œil des beagles HOG3700, H9L2210, HOB2357, H2F1068 et 7304871 .....	80
Figure 34 : Fonds d'œil du beagle H9L2210 .....	80
Figure 35: Fonds d'œil du beagle HOG3700.....	80
Figure 36 : Schémas du fond d'œil des beagles 1907192NYAA et H2E0725 .....	81

Figure 37 : Schémas des fonds d'œil des beagles 1927312NYAA et NEO .....	81
Figure 38 : Courbe obtenue aux cours de l'examen ERG de H2E0725 en ambiance scotopique.....	82
Figure 39 : Courbe obtenue aux cours de l'examen ERG de H2E0725 en ambiance photopique.....	83
Figure 40 : Photo du chien HOG3700.....	95
Figure 41 : Photo du chien 1907192NYAA.....	95
Figure 42 : Photo du chiot mâle de Turquoise-Saphir .....	96
Figure 43 : Photo du chiot femelle de Turquoise-Saphir .....	96
Figure 44 : Arbre généalogique des beagles provenant de l'élevage Harlan.....	98
Figure 45 : Alignement entre l'intron 86 de l'homme et l'intron 85 du chien du gène HERC2 .....	102
Figure 46 : Zone très conservée de HERC2 entre le chien et l'homme autour du SNP rs12913832 .....	103
Figure 47 : Alignement entre l'intron 12 de l'homme et l'intron 11 du chien du gène HERC2 .....	105
Figure 48 :Alignement entre l'intron 4 de l'homme et l'intron 3 du chien du gène HERC2 ..	106
Figure 49 : Séquence du chien correspondant à la région très conservée entre l'homme et le chien dans l'intron 85 du chien. ....	107
Figure 50 : Photographie du gel de vérification pour la PCR .....	107
Figure 51 : Alignement de la région séquencée de l'ADN de Turquoise, Sakura, Saphir, Brioche et de la base de donnée Ensembl. ....	108

# **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Affections oculaires héréditaires ou à prédisposition raciale chez le beagle .....	34
Tableau 2 : Liste des chiens inclus dans l'étude .....	67
Tableau 3 : Amorces choisies pour le séquençage d'une partie de l'intron 85 du gène HERC2 .....	73
Tableau 4 : Résultats de la réponse du test du clignement à la menace et du réflexe photomoteur .....	77
Tableau 5 : Résultats du test de Schirmer et de la pression intraoculaire .....	78
Tableau 6 : Résultats des ERG pour l'amplitude de l'onde b .....	84
Tableau 7 : Test U de Mann Whitney pour l'amplitude b .....	86
Tableau 8 : Résultats des ERG pour le temps de culmination de l'onde b .....	87
Tableau 9 : Test U de Mann Whitney pour le temps de culmination de l'onde b.....	89
Tableau 10 : Résultats des ERG pour l'amplitude de l'onde a .....	90
Tableau 11 : Test U de Mann Whitney pour l'amplitude de l'onde a.....	91
Tableau 12: Résultats des ERG pour le temps de culmination de l'onde a .....	92
Tableau 13 : Test U de Mann Whitney pour le temps de culmination de l'onde a.....	93
Tableau 14: Pelage autour des yeux des beagles ayant au moins un œil bleu .....	94
Tableau 15 : Croisements réalisées à l'ENVA.....	100
Tableau 16 : Résultat du SNP trouvé en fonction de la couleur des yeux .....	109
Tableau 17 : Résultat du génotypage du SNP dans l'intron 85.....	109
Tableau 18 : Effectifs et pourcentages des différents génotypes obtenus en fonction de la couleur des yeux chez les beagles .....	112
Tableau 19 : Effectifs attendus si la répartition des allèles était indépendante de la couleur des yeux.....	112



# LISTE DES ABREVIATIONS

$\alpha$ -MSH = *Alpha-melanocyte stimulating hormone*  
ADAMTS10 = *A disintegrin-like and a metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 10*  
ADN = Acide désoxyribonucléique  
APR = Atrophie progressive de la rétine  
BAC = *Bacterial artificial chromosome*  
CHUVA = Centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort.  
cM = Centimorgan  
cR = Centiray  
*DSCR9* = *Down syndrome critical region gene 9*  
ENVA = École nationale vétérinaire d'Alfort  
ERG = Électrorétinogramme  
F = *Foward*  
FGF = *Fibroblast growth factor*  
FISH = *Fluorescent in situ hybridization*  
Gb = Giga bases  
HERC2 = *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*  
HGF = *Hepatocyte growth factor*  
HGS = *Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*  
IgG = *Immunoglobuline G*  
IRF4 = *Interferon regulatory factor 4*  
kb = Kilobases  
KCS = Kérato-conjonctivite sèche  
LD = Déséquilibres de liaison  
LOD = *Logarithm of odds*  
LYST = *Lysosomal trafficking regulator*  
Mb = Mégabase  
MYO = *Myocilin*  
NPLOC4 = *Nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)*  
OCA2 = *Oculocutaneous albinism type 2*  
pb = Paire de bases  
PCR = *Polymerase chain reaction*  
PDE6G = *Phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma*  
QTL = *Quantitative trait locus*  
R = *Reverse*  
RH = *Radiation hybrids* = hybrides d'irradiation  
SCL45A2 = *Solute carrier family 45, member 2*  
SINE = *Short interspersed nuclear element*  
SLC2A4 = *Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4*  
SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*  
STS = *Sequence Tagged Sites*

TK = Thymidine kinase

Tm = Température d'hybridation des amorces

TTC3 = *Tetratricopeptide repeat domain 3*

TYR = *Tyrosinase*

TYRP1 = *Tyrosinase related protein 1*

USA = *United States of America*

UTR = *UnTranslated Region*

YAC = *Yeast Artificial Chromosome*

# INTRODUCTION

Chez les chiens de race beagle, dans certaines portées issues de parents aux yeux marron, sont apparus des chiots ayant les iris de couleur bleue. Ces chiots avaient les deux yeux bleus, les yeux vairons (un œil bleu et un œil marron) ou bien hétérochromiques (présence de plages bleues et marrons dans le même iris).

Nous nous sommes intéressés à des chiots beagle présentant des yeux vairons ou bleus, issus de pedigrees expérimentaux de chiens. Dans ces pedigrees, il n'est pas souhaitable d'avoir des chiots ayant les yeux bleus, ces derniers sont donc écartés de la reproduction. Aucune étude concernant le potentiel caractère héréditaire des « yeux bleus » n'avait donc été possible jusqu'à présent.

Nous avons souhaité comprendre le déterminisme des yeux bleus chez le beagle. Cependant, chez le chien, le mécanisme gouvernant la couleur des yeux est très mal connu. En revanche, chez l'homme plusieurs gènes impliqués dans la pigmentation de l'œil ont été découverts. Le but de notre étude était d'étudier le phénotype « yeux bleus » : impact de la couleur de l'iris sur l'anatomie et la fonctionnalité de l'œil ; de déterminer si les yeux bleus étaient héréditaires ; de déterminer leur éventuel mode de transmission ; et de rechercher la ou les éventuelles mutation(s) causale(s).

Dans la première partie de ce manuscrit nous rappelons l'anatomie et la pigmentation du globe oculaire ainsi que les examens ophtalmologiques réalisables chez le chien. Ensuite, nous faisons le point sur les différents gènes impliqués dans la pigmentation de l'œil décrits à ce jour chez l'homme, en abordant les différentes techniques génétiques disponibles pour la recherche d'un gène.

Dans une seconde partie, nous détaillons les conditions et les résultats de notre étude expérimentale qui a porté sur la caractérisation du phénotype « yeux bleus » rencontré chez des beagles présents à l'École nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA). Puis nous rapportons les résultats de l'étude génétique et moléculaire que nous avons menée et qui visait à mettre en évidence le mode de transmission et la ou les mutation(s) causale(s) des yeux bleus.



**PREMIÈRE PARTIE :**  
**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



# I. Structure et pigmentation du globe oculaire chez le chien

L'œil présente différents tissus dont certains sont pigmentés. Selon le degré de pigmentation, la coloration de l'iris et l'aspect du fond d'œil vont varier. Dans cette première partie bibliographique, nous traiterons du phénotype de la couleur de l'iris chez le beagle ainsi que des spécificités du fond d'œil canin.

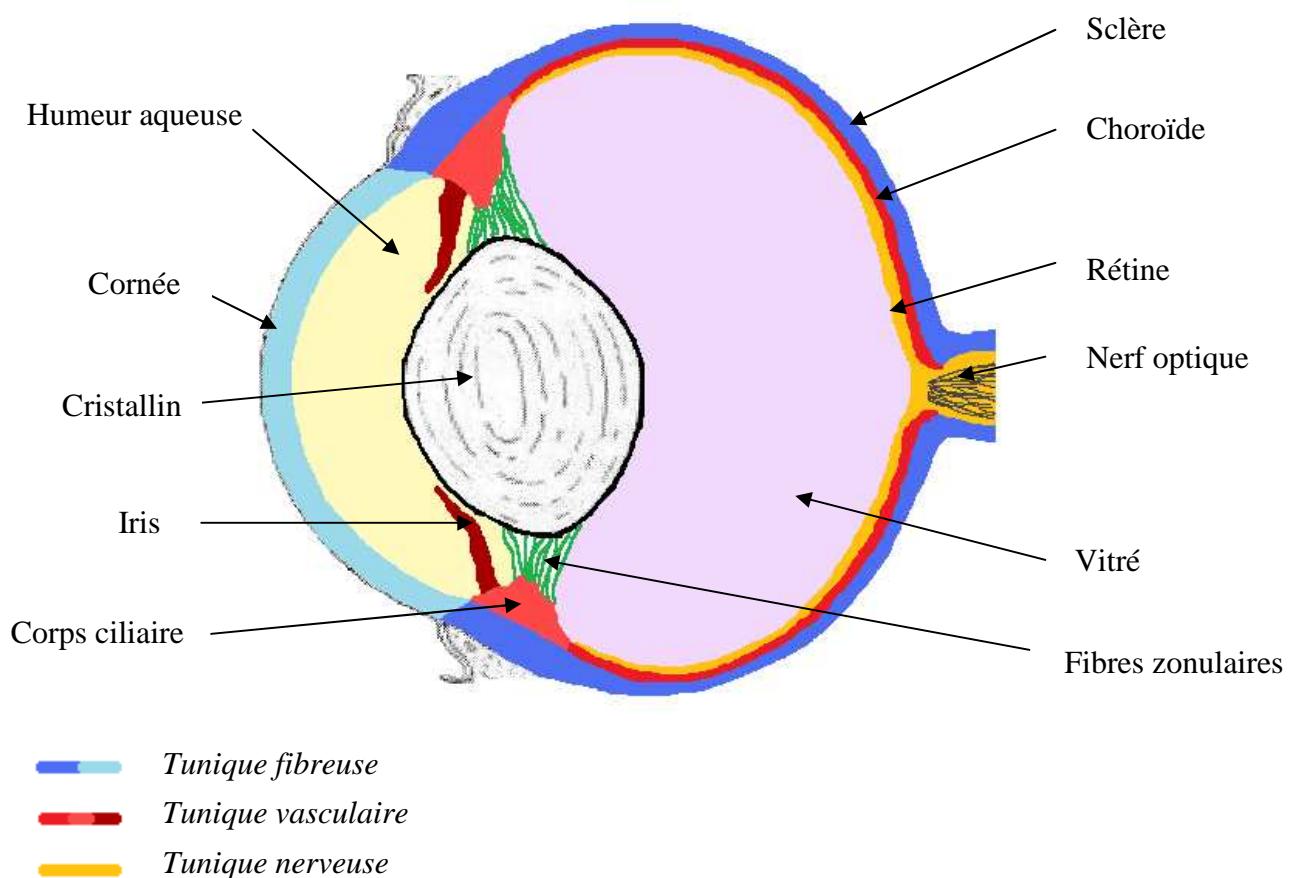
Dans une première partie, nous décrirons la structure du globe oculaire. Dans une deuxième partie nous étudierons les mécanismes généraux de la pigmentation, puis dans une troisième partie nous décrirons les spécificités de l'œil concernant cette pigmentation.

## I.1. Structure du globe oculaire

Le globe oculaire est formé de trois tuniques (*Figure 1*) : la tunique fibreuse (la plus externe), la tunique vasculaire et la tunique nerveuse (la plus interne). Ces trois tuniques sont détaillées ci-après.

De plus, le globe oculaire comporte des milieux intraoculaires transparents : l'humeur aqueuse, le vitré et le cristallin (lentille biconvexe). Ces milieux, n'intervenant pas dans la pigmentation de l'œil, ne seront pas étudiés ici.

*Figure 1 : Coupe schématique du globe oculaire de chien*



### I.1.1. La tunique fibreuse (47)

La tunique fibreuse est formée par la sclère et la cornée.

La sclère est opaque et blanchâtre. Elle est constituée d'un tissu conjonctif dense et de fibroblastes. De plus, elle est traversée par des vaisseaux ciliaires et des nerfs ciliaires.

La cornée est une structure totalement transparente (absence de vaisseaux, de pigmentation et de dépôts).

La tunique fibreuse ne comporte aucune cellule pigmentée, elle n'intervient donc pas dans le caractère phénotypique étudié ici.

### I.1.2. La tunique vasculaire

La tunique vasculaire, également dénommée uvée, comporte l'iris, le corps ciliaire, la choroïde. (47)

#### I.1.2.1. L'iris

L'iris est un diaphragme qui part du corps ciliaire jusqu'à la surface antérieure du cristallin ; en son centre il est percé par la pupille. Il peut moduler l'ouverture de la pupille grâce au muscle sphincter de la pupille innervée par les fibres parasympathiques du nerf oculomoteur (III) et le muscle dilatateur de la pupille innervée par les fibres orthosympathiques. La fonction de l'iris est de contrôler la quantité de lumière qui passe par la pupille. Lors de faible éclairage, la taille de la pupille augmente (mydriase), ce qui permet d'augmenter le nombre de stimulations des cellules photoréceptrices qui sont situées dans la rétine. Lors de fort éclairage, la taille de la pupille diminue, ce qui permet de diminuer le nombre de stimulations des cellules photoréceptrices. (21)

La structure de l'iris est divisée en face antérieure, stroma, muscles sphincter et dilatateur et épithélium postérieur. (47)

La face antérieure est bordée par des fibroblastes avec de larges espaces intercellulaires. Sous cette couche de fibroblastes, une ou plusieurs couches de mélanocytes sont présentes et ces couches s'entremêlent. Les granules de pigment des mélanocytes ont une forme en fer de lance à ovale. (47)

Le stroma de l'iris est composé de fibres de collagènes (en quantité importante), de chromatophores (mélanocytes) et de fibroblastes. Les mélanocytes sont surtout situés autour des vaisseaux sanguins. Les granules pigmentaires ont dans l'ensemble une forme ovale et en bâtonnets. La coloration de l'iris dépend en partie de la pigmentation du stroma de l'iris. Les variations de couleur de l'iris dépendent de la quantité de pigments, du type de pigment et du degré de vascularisation du stroma. (47)

Le muscle sphincter de l'iris est situé postérieurement au stroma et circulairement autour de la pupille chez le chien. (47)

La face postérieure de l'iris est constituée de deux couches de cellules épithéliales. La couche antérieure est en continuité avec l'épithélium pigmenté du corps ciliaire. Cette couche est formée par des cellules myoépithéliales qui contiennent des granules pigmentaires (de mélanine). De plus elle comprend le muscle dilatateur de l'iris qui va du muscle sphincter à la

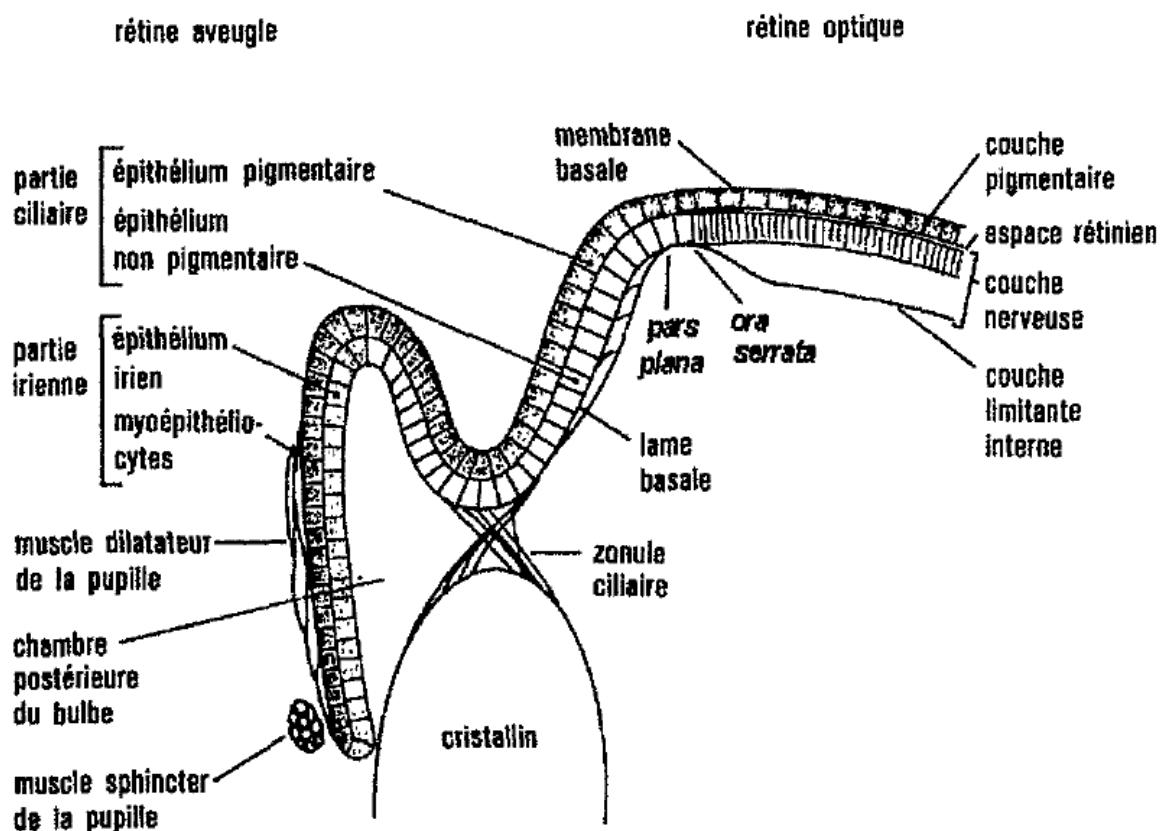
périphérie de l'iris. La couche postérieure est très pigmentée et elle est en continuité avec l'épithélium non pigmenté du corps ciliaire. (Figure 2) (47)

### I.1.2.2. Le corps ciliaire

Le corps ciliaire est situé en arrière de l'iris sur toute la circonférence du globe. Il permet la production de l'humeur aqueuse et il sert d'insertion aux fibres zonulaires entourant le cristallin. Lors de contraction du corps ciliaire, les fibres zonulaires tirent sur le cristallin, ceci permettant l'accommodation. Le corps ciliaire est très pigmenté et la pigmentation diminue avec l'âge. Histologiquement, le corps ciliaire est constitué d'un procès ciliaire, de muscle ciliaire et de l'angle irido-cornéen. (47)

Le procès ciliaire est composé d'un stroma avec des vaisseaux sanguins et d'une double assise de cellules épithéliales. La couche épithéliale la plus interne est non pigmentée. Elle est prolongée antérieurement par la couche postérieure de l'épithélium pigmenté de l'iris et postérieurement par la neurorétine. La couche épithéliale la plus externe est pigmentée. Elle se poursuit antérieurement par la couche antérieure de l'épithélium de l'iris et postérieurement par l'épithélium pigmenté de la rétine. (Figure 2) (47)

Figure 2 : Organisation de la rétine et continuité avec le corps ciliaire et l'iris (48)



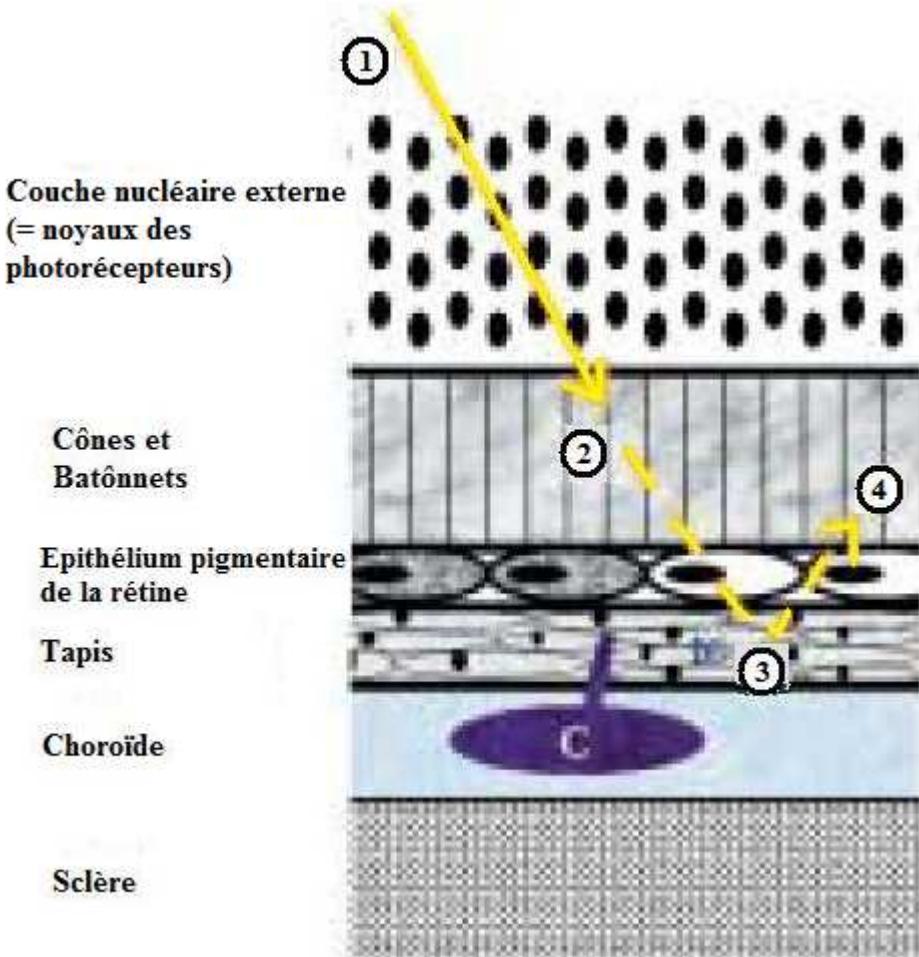
### I.1.2.3. La choroïde et le tapis

La choroïde se situe entre la sclère et la rétine. Elle tapisse le pôle postérieur de l'œil. Elle est richement vascularisée et pigmentée, contenant de nombreux mélanocytes riches en mélosomes (granules pigmentaires). La choroïde possède une couche de réseau de petits

capillaires anastomosés connu sous le nom de complexe choriocapillaire, situé juste sous l'épithélium pigmentaire de la rétine. Elle possède dans la zone dorsale du fond d'œil une structure appelée le tapis. (47)

Chez le chien, le tapis est de type cellulaire, appelé tapetum lucidum cellulosum. Il augmente la stimulation des photorécepteurs en réfléchissant les rayons lumineux, ce qui est un avantage en faible luminosité. (*Figure 3*). Le tapis se développe tardivement au cours de la croissance jusqu'à l'âge de 4 mois. A l'examen du fond d'œil, le tapis couvre plus de 30% de la superficie supérieure du fond d'œil. Il a une forme de triangle équilatéral aux bords arrondis. (41)

*Figure 3 : Emplacement et fonction du tapis choroïdien de type cellulaire chez le chien (41)*



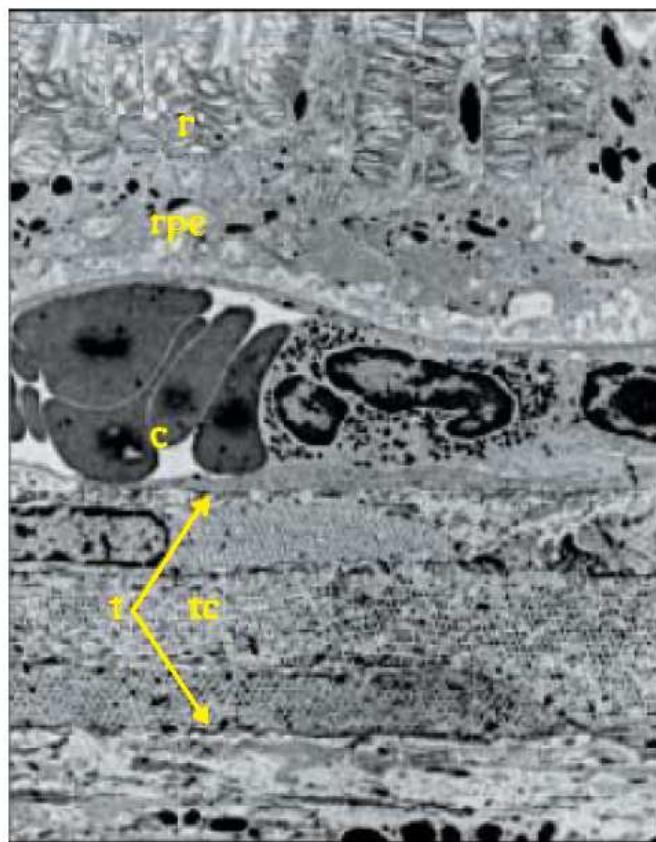
*Les capillaires (C) sont représentés en violet et traversent perpendiculairement le tapis pour émerger sous l'épithélium rétinien. En regard du tapis, l'épithélium de la rétine est non pigmenté permettant le passage des rayons lumineux.*

*Le trajet lumineux est représenté par une flèche jaune : 1.Rayon lumineux entrant ; 2.Première stimulation des cônes et des batonnets ; 3.Réflexion sur le tapetum lucidum ; 4.Seconde stimulation des cônes et des batonnets.(41)*

Chez le chien, le tapis est composé de couches de cellules rectangulaires. Il est interposé entre les gros vaisseaux du stroma de la choroïde et le complexe choriocapillaire ; ainsi des vaisseaux sanguins pénètrent dans le tapis pour alimenter les choriocapillaires

(Figure 3). L'épaisseur du tapis varie. En son centre, il est multicouche et il s'amincit pour ne former qu'une seule couche de cellules vers la périphérie et la zone adjacente au nerf optique. Au bord externe du tapis, les cellules du tapis sont progressivement remplacées par des mélanocytes de la choroïde. Ainsi les couches de mélanocytes augmentent progressivement vers la périphérie du tapis. Les cellules du tapis ont un cytoplasme rempli de granules contenant des matériaux réfléchissants (cystéine, zinc) de même que les mélanocytes du tapis dont les granules sont remplis de mélanine. La grande différence entre ces deux cellules (mélanocytes et cellules du tapis) est le fait que les cellules du tapis ont une répartition très ordonnée de leurs granules en forme de bâtonnets contrairement aux mélanocytes ayant une répartition aléatoire des grains de mélanine (Figure 4). (41)

*Figure 4 : Coupe histologique du tapis d'un chien vue sous microscope électronique (41)*



*Les cellules du tapis ont dans leur cytoplasme des bâtonnets bien ordonnés (points noirs). r. neurorétine ; rpe. épithélium pigmentaire de la rétine ; c. capillaires ; t. tapetum lucidum ; tc. cellule du tapis.*

### I.1.3. La tunique nerveuse

La tunique nerveuse, également dénommée rétine, est constituée de deux couches : l'épithélium pigmentaire de la rétine et la neurorétine. La rétine est la tunique la plus interne de l'œil. Elle est responsable de la transmission du signal lumineux aux fibres du nerf optique. La rétine est irriguée par deux systèmes vasculaires : les vaisseaux de la choroïde et les vaisseaux rétiniens. (12)

### **I.1.3.1. L'épithélium pigmentaire**

L'épithélium pigmentaire de la rétine est constitué d'une seule assise de cellules cuboïdes remplies de mélosomes. Il est étroitement adhérent à la choroïde dont il est séparé par la membrane de Bruch. Cette dernière laisse passer des petites protéines et permet les échanges entre la choroïde et l'épithélium pigmentaire. (34) (47)

En regard de la zone du tapis, l'épithélium pigmentaire ne présente pas de pigment de mélanine ; il est transparent et laisse passer la lumière. (*Figure 5*). En regard de la zone sans tapis, l'épithélium pigmentaire est rempli de pigments mélaniques qui peuvent se répartir dans la cellule de façon différente en fonction de l'éclairement. En effet, en phase d'éclairage, les pigments mélaniques migrent vers les villosités du pôle apical des cellules qui s'insinuent entre les cellules photoréceptrices. Ils protègent les segments externes des cellules photoréceptrices lors d'une luminosité trop importante. À l'inverse, à l'obscurité, les pigments quittent les villosités et migrent vers le pôle basal, laissant parvenir un maximum de lumière jusqu'aux cellules photoréceptrices. (*Figure 6*) (47) (57)

*Figure 5 : Coupe schématique de fond d'œil de chien (12)*

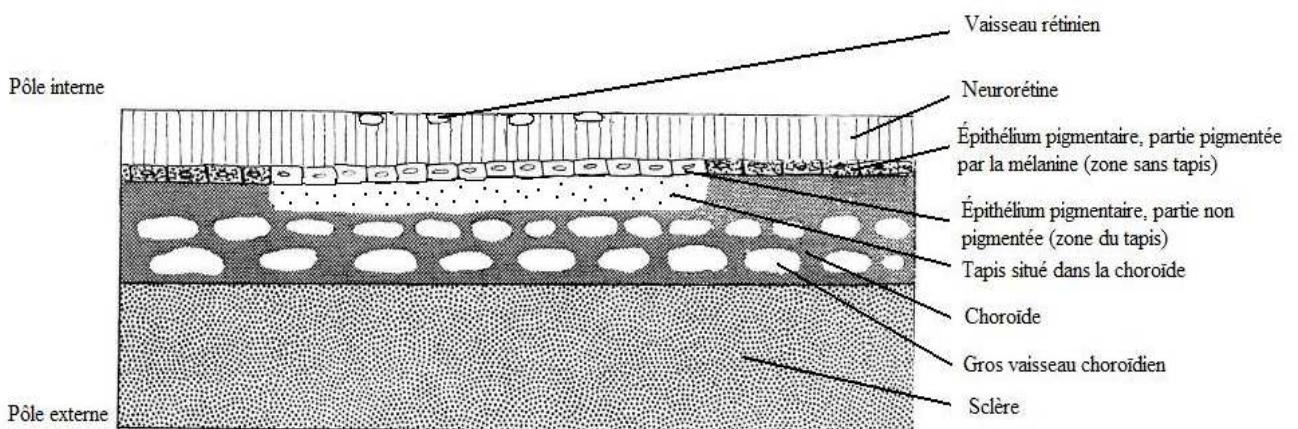
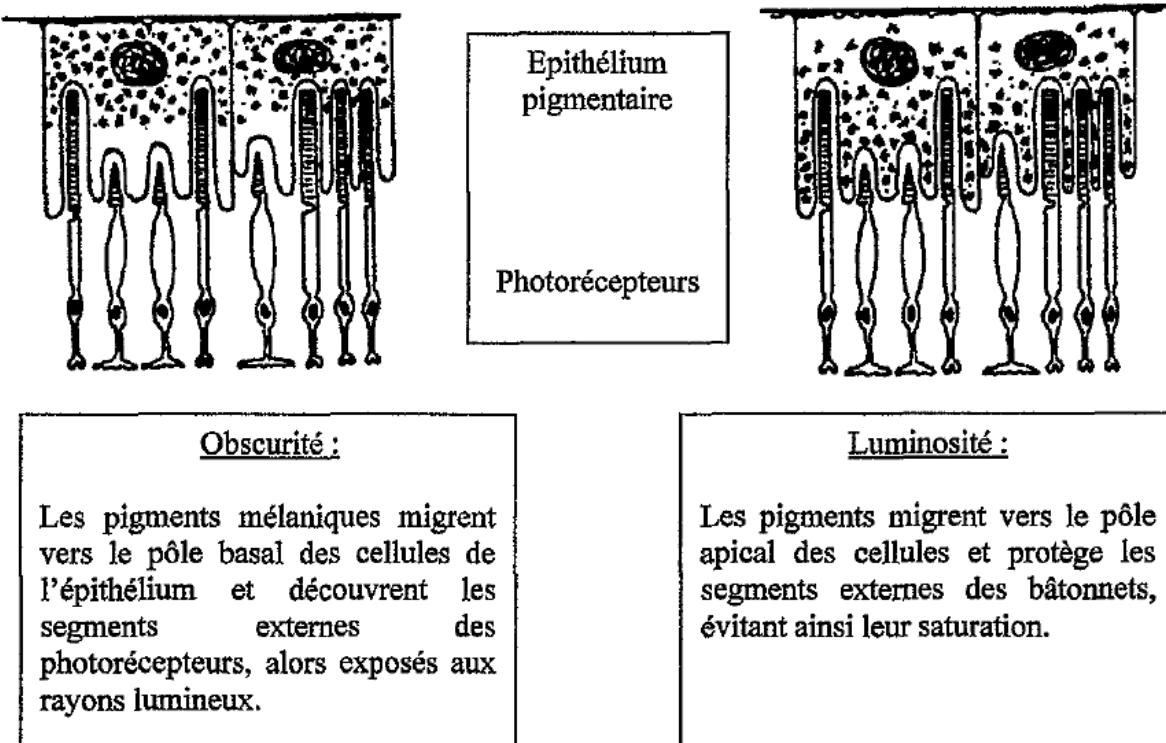


Figure 6 : Micromouvements pigmentaires rétiniens sous l'influence de la lumière (48)



La fonction de l'épithélium pigmentaire est fondamentale (57) :

- il intervient en tant qu'écran,
- il est responsable de la nutrition des couches externes de la rétine,
- il sélectionne les molécules transitant vers la rétine,
- il régule le développement et la régénération des photorécepteurs. (57)

#### ***I.1.3.2. La neurorétine***

La neurorétine se situe en avant de l'épithélium pigmentaire. Structure transparente, elle se compose de cellules nerveuses (photorécepteurs, cellules bipolaires, cellules ganglionnaires, cellules horizontales, cellules amacrines) et de cellules de soutien de la rétine (cellules de Müller). Ces dernières jouent un rôle structural et nutritionnel pour les cellules nerveuses. (29) (34) (57)

Le signal lumineux est recueilli par les photorécepteurs, dont il existe deux catégories : les bâtonnets et les cônes.

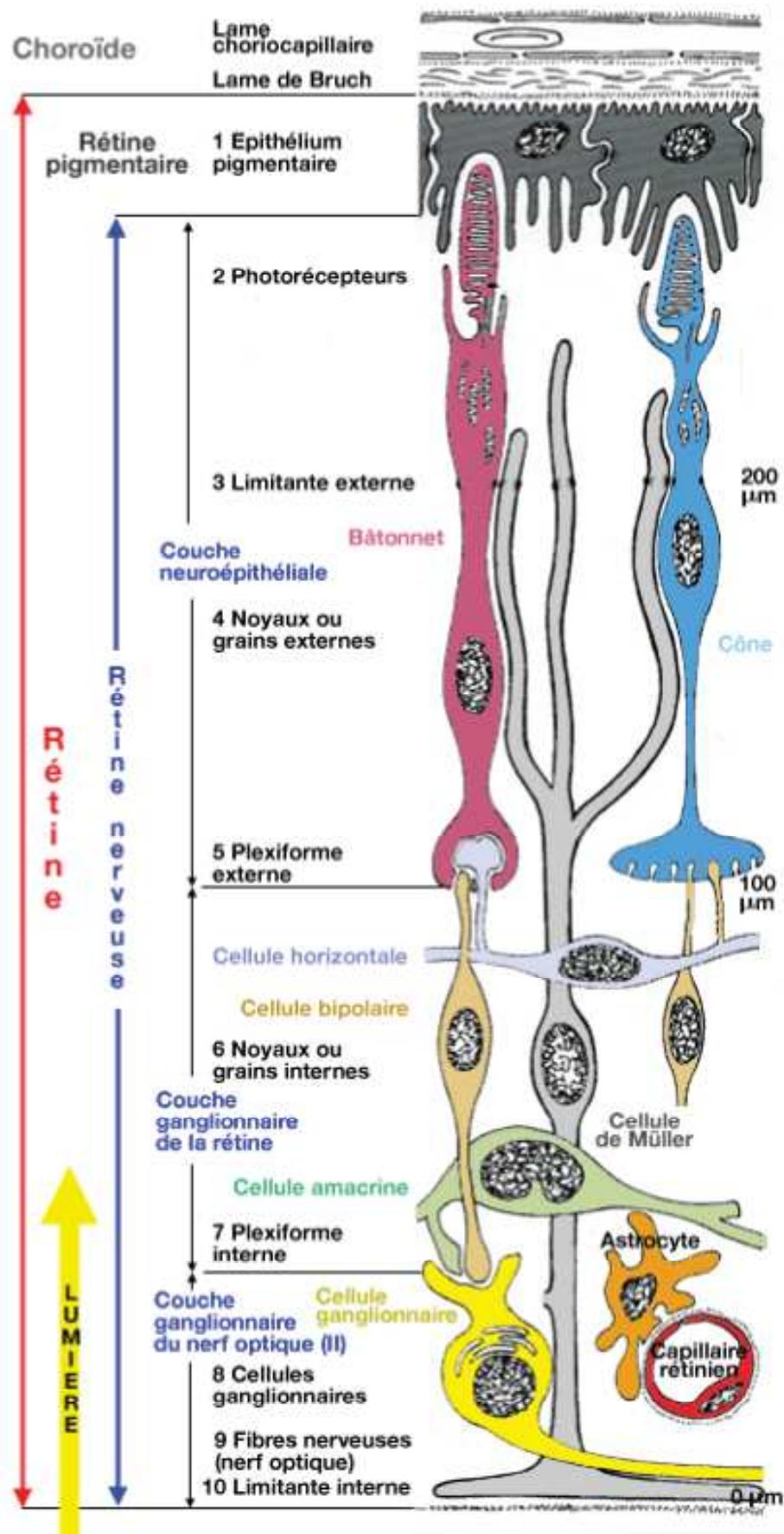
Les bâtonnets ont un seul type de photopigment : la rhodopsine. Ils contribuent à la vision achromatique. Ils ont également une forte sensibilité à la lumière et sont saturables : ils sont adaptés à une vision en ambiance scotopique (pénombre).

Chez le chien, les cônes sont constitués de deux types de photopigments (nommés les opines) : certains absorbant dans le bleu, et les autres absorbant dans le vert. Ils contribuent à

la vision des couleurs. Leur sensibilité lumineuse est faible et non saturable : ils sont adaptés à une vision en ambiance photopique (forte luminosité). (29)

Après avoir été recueilli par les cellules photoréceptrices, le signal lumineux est transmis de façon verticale et horizontale. La transmission verticale se fait des cellules photoréceptrices aux cellules bipolaires puis vers les cellules ganglionnaires. La transmission horizontale se fait via les cellules horizontales et amacrines, ces dernières jouant un rôle d'intégration et de modulation du signal. Les cellules ganglionnaires transmettent les informations lumineuses au cortex cérébral via les fibres du nerf optique (axones des cellules ganglionnaires) qui se dirigent de façon centripète vers la papille (émergence du nerf optique). (*Figure 7*) (29) (34)

Figure 7 : Organisation schématique de la rétine (31)

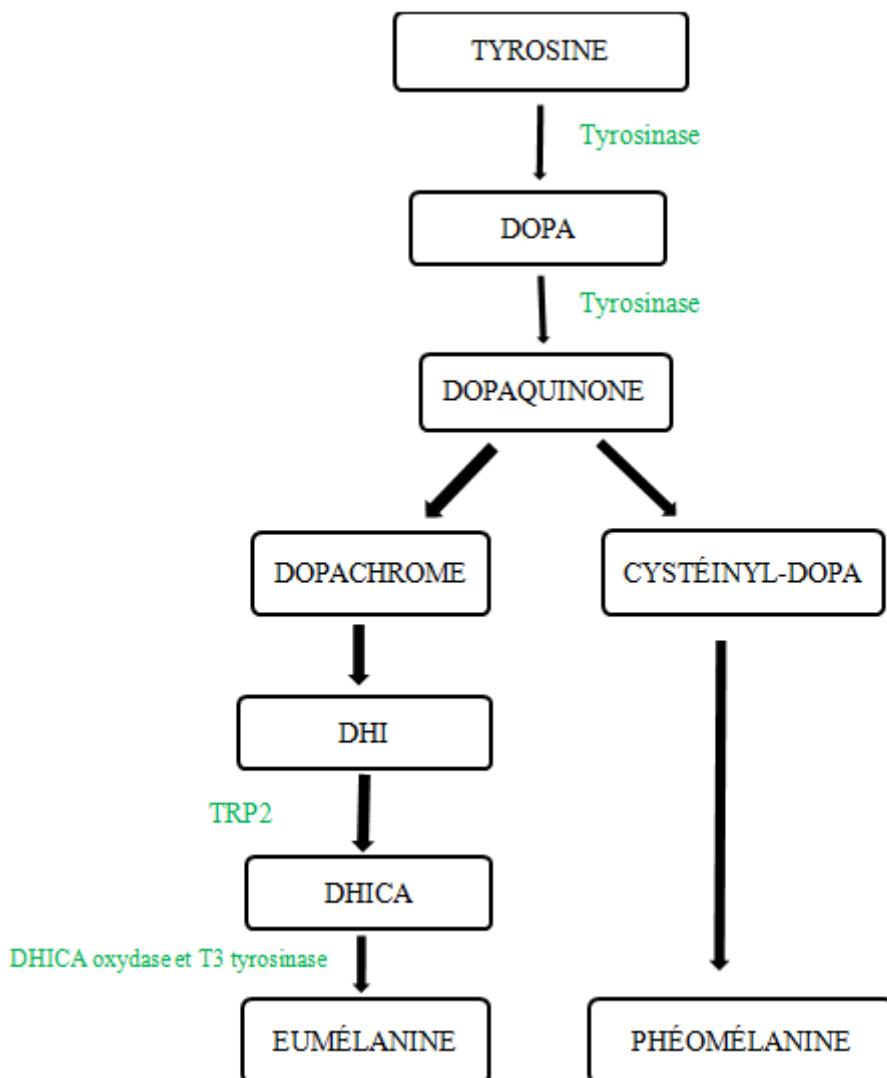


## I.2. Pigmentation des tissus

Les mélanocytes sont responsables de la pigmentation des tissus (peau, poils, œil). Ils ont une origine ectodermique et dérivent de la crête neurale. Ils migrent dans l'organisme au cours du développement embryonnaire. (1)

Les mélanocytes synthétisent des pigments : les mélanines. Il existe deux types de pigments : l'eumélanine (noir-marron) et la phéomélanine (jaune-orangée). Ces deux dernières sont produites à partir de la L-tyrosine suivant une cascade d'évènements décrite dans la *Figure 8.* (1)

*Figure 8 : Synthèse des mélanines (1)*



La tyrosine peut aboutir à deux types de pigment, la phéomélanine et l'eumélanine, en fonction de la voie de synthèse. Les enzymes catalysant les différentes réactions sont indiquées en vert entre les substrats et produits qui sont encadrés.

La synthèse des mélanines est soumise à des régulations complexes en particulier par des hormones et des cytokines :  $\alpha$ -MSH (*alpha-melanocyte stimulating hormone*), FGF (*fibroblast growth factor*) basique, HGF (*hepatocyte growth factor*), insuline ; ainsi que par certaines prostaglandines. (1)

Les mélanocytes contiennent des mélanosomes qui sont des organites cytoplasmiques, vésicules apparentées aux lysosomes. Les mélanosomes sont remplis d'enzymes permettant la synthèse de mélanine. (1)

Il existe quatre stades de développement des mélanosomes : les stades I et II (prémélanosomes) où les organites ne sont pas mélanisés, le stade II présentant une structure interne filamentuse, le stade III où la mélanine s'accumule, le stade IV où l'accumulation de mélanine est telle que la structure interne lamellaire n'est plus visible. La pigmentation des tissus se fait ensuite par le transfert des mélanosomes des mélanocytes à d'autres cellules. (1)

### I.3. Spécificités de la pigmentation de l'œil

En fonction de la couleur des yeux, la pigmentation de certaines structures de l'œil varie. De plus, au cours du développement embryonnaire, les mélanocytes proviennent de la crête neurale et les différentes cellules pigmentées de l'œil ne dérivent pas des mêmes tissus : la partie antérieure de l'iris (couche antérieure et stroma), le stroma du corps ciliaire et la choroïde sont dérivés du mésoderme tandis que la partie postérieure de l'épithélium pigmentaire de l'iris, l'épithélium pigmentaire du corps ciliaire et la rétine proviennent du neuroectoderme. Ainsi, les mélanocytes se développent dans deux tissus d'origine embryologique différente qui ne sont pas atteints de la même manière en fonction de la couleur des yeux. (39) (44)

#### I.3.1. Distribution de la mélanine dans l'œil

La mélanine présente dans l'œil se situe principalement dans l'iris, le corps ciliaire et l'épithélium pigmentaire de la rétine. La teneur en mélanine est plus ou moins forte en fonction des tissus et peut varier au sein d'un même tissu. Chez le chien, la choroïde et l'épithélium pigmentaire de la rétine sont plus concentrés en mélanine que la rétine. À la périphérie de la rétine, la teneur en mélanine est plus forte qu'en son centre. La sclère possède moins de mélanine que la rétine. De plus, il existe des teneurs différentes en mélanine en fonction de la race, de la couleur des yeux et de l'âge. La quantité de mélanine dans l'épithélium pigmentaire de la rétine diminue avec l'âge. La teneur en mélanine est différente dans l'iris, le corps ciliaire et la choroïde-épithélium pigmentaire de la rétine en fonction de la couleur des yeux. (17)

#### I.3.2. Pigmentation de l'iris

La couleur de l'iris est déterminée par deux types de cellules pigmentées : les cellules de la face postérieure de l'iris composé de deux couches épithéliales et les mélanocytes du stroma de l'iris. La coloration de l'iris est déterminée par trois facteurs majeurs : les granules pigmentées dans l'épithélium de l'iris, la concentration des pigments dans les mélanocytes du stroma et les propriétés de diffusion de la lumière et d'absorption des éléments

extracellulaires. La nature des pigments présents joue également un rôle dans la couleur de l'iris. (44)

#### **I.3.2.1. Chez l'homme**

D'après Prota *et al.* (44), quelle que soit la couleur de l'iris, l'épithélium postérieur de l'iris présente une quantité élevée d'eumélanine ainsi que de grands mélanosomes. Dans le stroma et l'épithélium antérieur de l'iris, les mélanocytes contiennent des mélanosomes moins pigmentés et plus petits et d'autres cellules pigmentées tels que les mélanophages (cellules de Koganei). Ces dernières sont présentes en faible quantité et sont remplies de mélanosomes semblables à ceux de l'épithélium postérieur de l'iris. Par contre, la quantité et le type de pigment changent en fonction de la couleur de l'iris. L'iris bleu présente peu d'eumélanine et de phéomélanine tandis que l'iris vert présente beaucoup plus de phéomélanine que d'eumélanine. L'iris marron contient beaucoup de phéomélanine et d'eumélanine. Notons que la phéomélanine et l'eumélanine dans l'iris ont aussi été détectés chez d'autres mammifères que l'homme (singes, lapins). Ainsi, le métabolisme de base dans la pigmentation de l'iris chez les mammifères est similaire à celui de l'homme.

#### **I.3.2.2. Chez le chien**

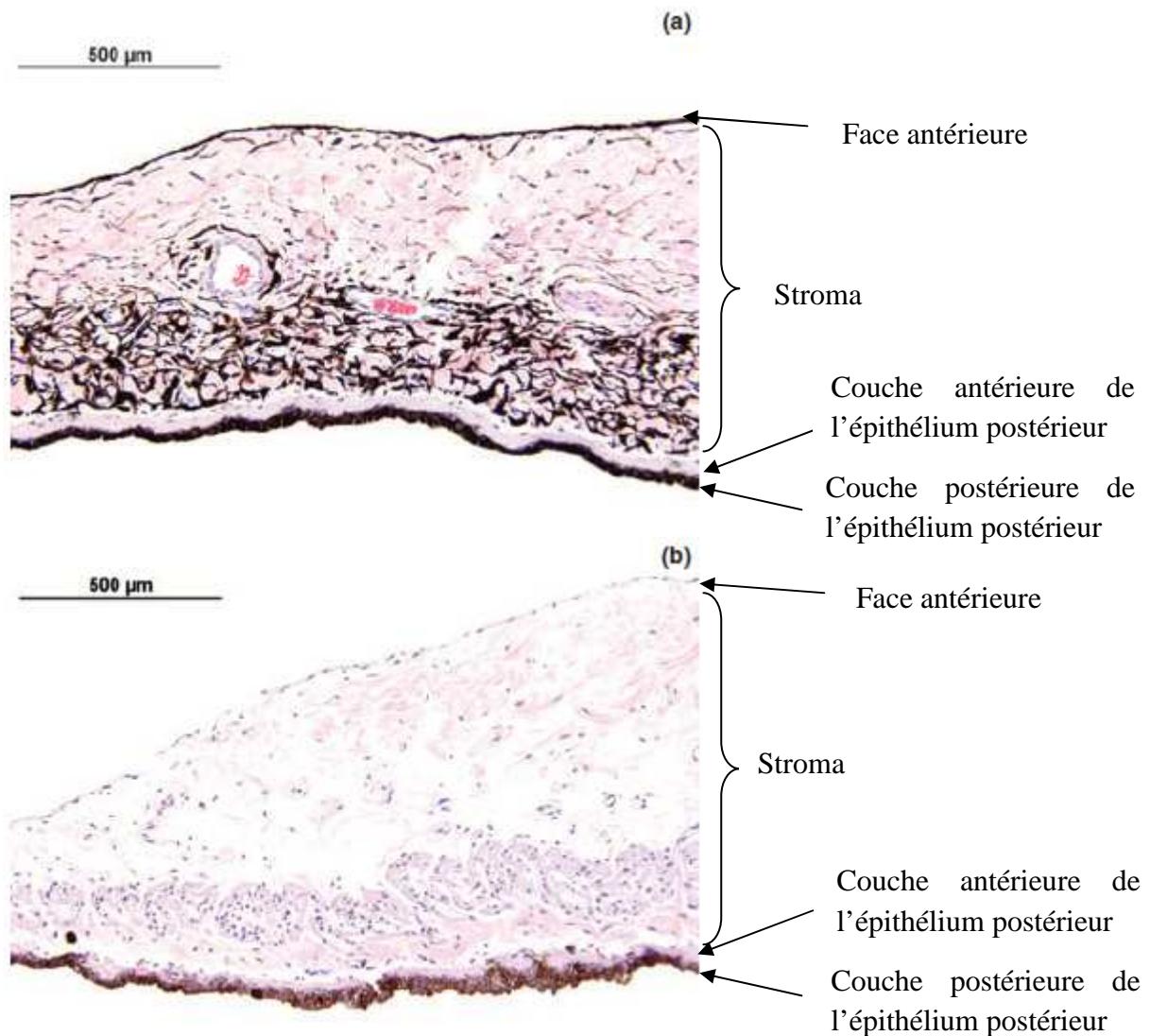
Il existe des variations importantes dans la pigmentation de l'iris chez les chiens sains, donnant des différences marquées de la couleur des yeux (marron, ambre, bleu,) entre les races et au sein même d'une race. Parfois, la couleur des yeux est associée à la robe comme par exemple les chiens ayant des yeux bleus qui peuvent être porteurs d'une robe merle (berger australien, border collie, dogue allemand, teckel) ou avoir du blanc autour des yeux. Mais la couleur des yeux peut aussi être indépendante de la robe. (21)

L'**hétérochromie** de l'iris est une différence de couleur entre l'iris des deux yeux ou entre des parties d'un même iris. L'hétérochromie de l'iris est présente dans de nombreuses races comme le berger australien, le border collie, le dogue allemand, le teckel, le welsh corgi, le beagle, le bobtail, le husky de Sibérie, le foxhound américain, le cocker américain, le malamute et le shih tzu. (21)

Le **subalbinisme** est dû à un manque de pigmentation dans les structures de l'œil. Il est différent de l'albinisme dans le fait que la pigmentation n'est pas totalement absente. Le chien possède un iris de couleur bleue avec un fond d'œil majoritairement rouge. Dans le cas d'un albinisme, l'iris est translucide ce qui permet de rendre visible les vaisseaux sanguins et ainsi de donner une couleur rouge à l'iris. Le subalbinisme est présent dans de nombreuses races : husky de Sibérie, bouvier bernois, dogue allemand, berger australien, border collie, beagle, welsh corgi, dalmatien, colley). L'albinisme vrai n'a jamais été observé chez le chien.(21)

Chez le chien, la pigmentation de la partie antérieure de l'iris et de la partie musculaire du corps ciliaire est moins intense chez les yeux bleus. L'épithélium postérieur de l'iris et les procès ciliaires ne présentent pas de différence de pigmentation entre les yeux marron et les yeux bleus. (*Figure 9 et Figure 10*) (39) (50)

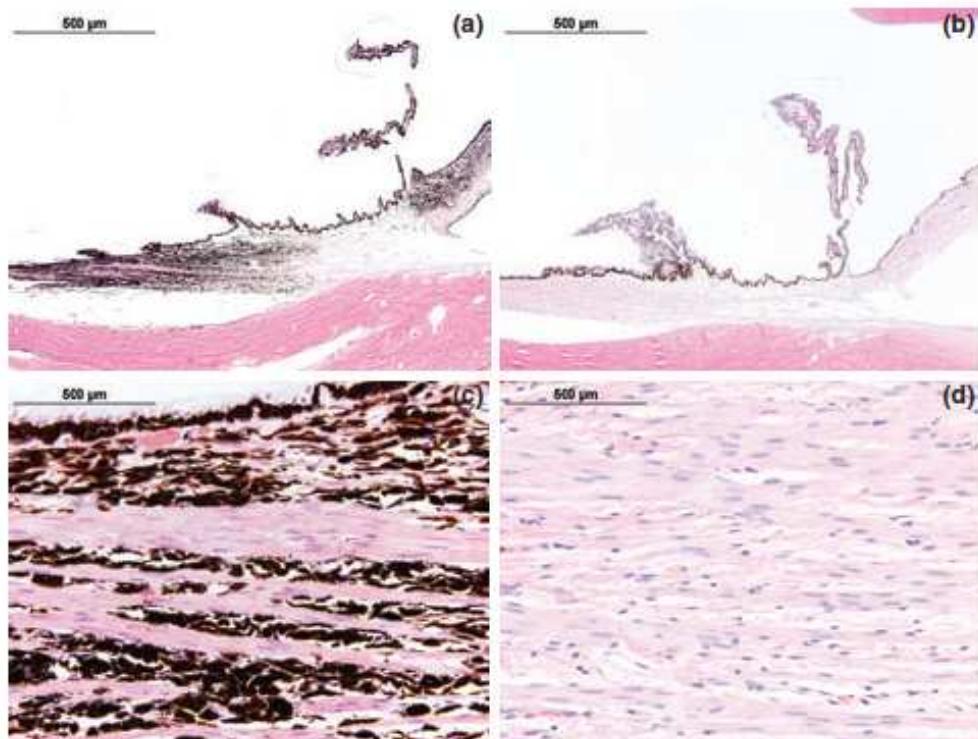
Figure 9 : Coupe histologique montrant la distribution des pigments dans l'iris (39)



(a) Iris de couleur marron, présence de pigmentation dans la partie antérieure de l'iris et dans la couche postérieure de l'épithélium de l'iris.

(b) Iris de couleur bleue, absence de pigmentation dans la partie antérieure de l'iris et présence de pigmentation dans la couche postérieure de l'épithélium de l'iris.

*Figure 10 : Coupe histologique montrant la distribution des pigments dans le corps ciliaire* (39)



(a) (c) *Corps ciliaire d'un œil marron ayant de la pigmentation dans la partie musculaire et dans l'épithélium pigmentaire.*

(b) (d) *Corps ciliaire d'un œil bleu présentant de la pigmentation dans l'épithélium pigmentaire et une absence de pigmentation dans la partie musculaire.*

Dans l'étude de Newkirk *et al.* (39), un chien avec un œil bleu et un œil marron étudié avait la portion dorsale du corps ciliaire peu pigmentée et la portion ventrale très pigmentée pour les deux yeux. De plus certains chiens aux yeux bleus présentaient en dessous de la pars plana (portion du corps ciliaire située entre les procès ciliaires et la rétine) des cellules chargées de pigments. L'emplacement sous-épithérial et la morphologie de ces cellules font penser aux mélanophages constatés dans la perte de migration de la mélanine cutanée de la couche basale de l'épithélium.

## **II. Examen ophtalmologique chez le chien**

Afin de différentier les phénotypes associés aux couleurs des iris des beagles, un examen ophtalmologique peut être pratiqué.

### **II.1. Examen du segment antérieur de l'œil**

Le segment antérieur de l'œil (conjonctive, cornée, chambre antérieure, iris, pupille) peut être observé à l'aide d'un transilluminateur ou d'une lampe à fente. Le transilluminateur est une source lumineuse de forte intensité. La lampe à fente ou biomicroscope permet d'obtenir une excellente illumination et un très bon grossissement permettant ainsi d'observer des lésions non visibles à l'œil nu.(21) (54)

Ces deux techniques d'observation permettent de caractériser l'iris par :

- sa couleur,
- sa consistance,
- sa forme (présence d'adhérences ou de masses, persistance de membrane pupillaire),
- sa taille (anisocorie), sa forme (synéchies, brides iriennes) et la stabilité de la pupille. (21) (54)

### **II.2. Examen et aspect du fond d'œil**

Pour cet examen, une ambiance lumineuse faible est recommandée. De plus, la dilatation pupillaire par instillation d'un collyre à action parasympatholytique est préconisée.

Lors d'un examen ophtalmoscopique, le fond d'œil peut être observé par ophtalmoscopie directe ou indirecte. En ophtalmoscopie directe, le fond d'œil est examiné par un ophtalmoscope réglé sur 0 dioptrie (0 δ). Cet appareil offre un fort grossissement et par conséquent un champ de vision réduit. L'ophtalmoscopie indirecte est réalisée à l'aide d'une lentille en général de 20 dioptries (20δ) chez le chien et d'une source lumineuse puissante.

Elle offre un champ d'observation étendu permettant d'avoir une vision globale du fond d'œil. Toutefois, l'image du fond d'œil est inversée de haut en bas et l agrandissement est plus faible qu'en ophtalmoscopie directe. L'ophtalmoscopie indirecte binoculaire permet également d'examiner la rétine en trois dimensions (l'image 3D du fond de l'œil est également inversée. (21) (54)

Le fond d'œil reflète la structure interne de l'œil (la rétine, la choroïde et la partie émergente du nerf optique) : il se compose d'une papille, d'une zone du tapis en partie dorsale, d'une zone sans tapis et de vaisseaux rétiniens. L'aspect du fond d'œil varie énormément chez le chien et il est possible d'observer différentes couleurs du tapis, l'absence de tapis, différents degrés de pigmentation de la zone sans tapis, différentes formes de la papille et une large gamme de dispositions vasculaires. (21)

Chez le chien, la papille est de forme variable (triangulaire, ronde ou polygonale), de couleur blanche à rosée et est bien vascularisée. (21)

La zone du tapis est très colorée grâce au reflet d'une structure cristalline réfringente localisée dans la choroïde. Sa couleur est très variable (orangée, rouge, verte, bleue, jaune) et dépend de la robe du chien, de la pigmentation de l'œil et des races. Le tapis peut être occasionnellement absent chez le chien, comme par exemple chez les chiens possédant une robe merle (border collie, shetland par exemple). L'ensemble du fond d'œil ressemble alors à la zone sans tapis. (21) (54)

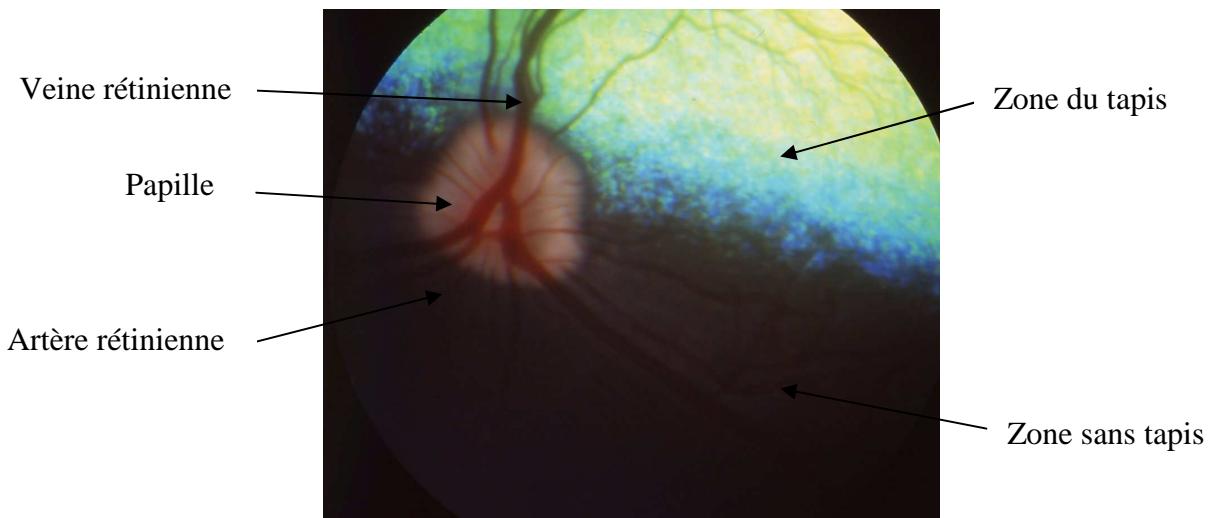
La zone sans tapis, localisée en périphérie et en zone ventrale, est de couleur brune plus ou moins foncée à cause de la pigmentation de l'épithélium pigmentaire.

Dans le cas des chiens avec un fond d'œil subalbinos, la zone sans tapis est dépigmentée (l'épithélium pigmenté et la choroïde sont peu pigmentés). En conséquence les vaisseaux de la choroïde deviennent visibles. Les gros vaisseaux choroïdiens se distinguent sur un fond blanc correspondant à la sclère et donnent une couleur rouge brique au fond d'œil. La présence du tapis est variable. (21) (54)

Les vaisseaux rétiniens apparaissent nets et de couleur rouge vif. Les veines rétiniennes sont de plus gros calibre que les artères. Tous les vaisseaux rétiniens convergent vers la papille et sont habituellement disposés en Y renversé. Les veines s'anastomosent au centre de la papille et les artères s'arrêtent en périphérie. (21) (54) (*Figure 11*).

Chez le chien, le fond d'œil n'est pas totalement mature à la naissance : il acquiert son aspect définitif vers l'âge de 12 à 16 semaines après la naissance. (21)

*Figure 11 : Fond d'œil d'un beagle ayant les iris de couleur marron*



Source : Unité d'ophtalmologie, CHUVA, ENVA

## II.3. Electrorétinogramme

L’electrorétinogramme (ERG) fournit de façon non invasive une évaluation de la fonction électrophysiologique rétinienne suite à une stimulation lumineuse (les voies en aval ne sont donc pas évaluées). Cet examen permet d’évaluer l’intégralité des couches rétinien-nes y compris l’épithélium pigmentaire. L’ERG enregistre les variations de potentiels électriques de la rétine en réponse à des stimulations lumineuses grâce à l’électrode active placée au niveau de la cornée, à l’électrode de référence placée sous la peau dans le canthus externe et à l’électrode de terre située au niveau de la crête occipitale (*Figure 12*). (54)

*Figure 12 : Emplacement des électrodes lors de l’electrorétinogramme*



*Source : Unité d’ophtalmologie, CHUVA, ENVA*

Après stimulation lumineuse, l’enregistrement aboutit à un tracé comportant deux ondes principales.

L’onde a correspond à la première inflexion de l’ERG. Elle a une amplitude négative et représente la réponse des photorécepteurs rétinien-s à la stimulation lumineuse. L’onde a est caractérisée par deux paramètres : son amplitude (elle est déterminée depuis la ligne de base jusqu’au pic de la première inflexion de la courbe, et s’exprime en microvolts ( $\mu$ V) et son temps de culmination (il est calculé entre le moment de la stimulation et le point d’infexion maximal de l’onde a, et est exprimé en millisecondes (ms)). (29) (34)

L’onde b correspond à la deuxième inflexion de l’ERG. Elle a une grande amplitude positive et correspond à la réponse des cellules bipolaires suite à la stimulation des photorécepteurs par un stimulus lumineux. L’onde b est caractérisée par les deux paramètres cités précédemment. Son amplitude est déterminée par la hauteur du pic de l’onde b moins l’amplitude de l’onde a. (29) (34)

L'enregistrement d'un ERG peut faire suite à trois types de stimulations lumineuses :

- la stimulation scotopique est réalisée avec une faible intensité lumineuse ( $0,03 \text{ cd/m}^2/\text{s}$ ) et mesure essentiellement l'activité des bâtonnets et l'adaptation à l'obscurité. Le graphique obtenu (*Figure 13*) lors de la stimulation scotopique possède seulement une onde b ; (29) (34)
- la stimulation photopique est réalisée avec une forte intensité lumineuse ( $3 \text{ cd/m}^2/\text{s}$ ). Elle permet d'évaluer l'activité mixte des bâtonnets et des cônes. Le graphique obtenu (*Figure 14*) lors de la stimulation photopique possède une onde a et une onde b ;
- le flicker est une succession de flashes de forte intensité lumineuse ( $3 \text{ cd/m}^2/\text{s}$ ) à une fréquence de 31Hz. Il permet d'évaluer l'activité des cônes. Le graphique obtenu (*Figure 15*) lors du flicker possède plusieurs ondes positives. (29) (34)

*Figure 13 : Détermination des caractéristiques de l'onde b lors de la réponse de la rétine globale à un flash lumineux unique en ambiance scotopique (ERG du chien H2F0725)*

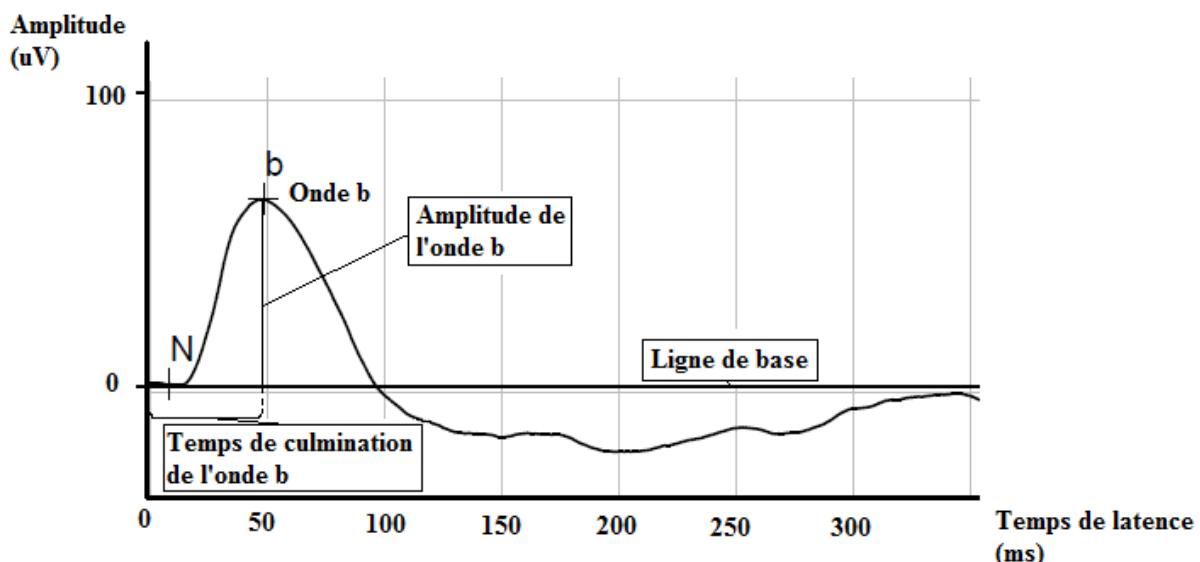


Figure 14 : Détermination des caractéristiques des ondes a et b lors de la réponse de la rétine globale à un flash lumineux unique en ambiance photopique (ERG du chien H2F0725)

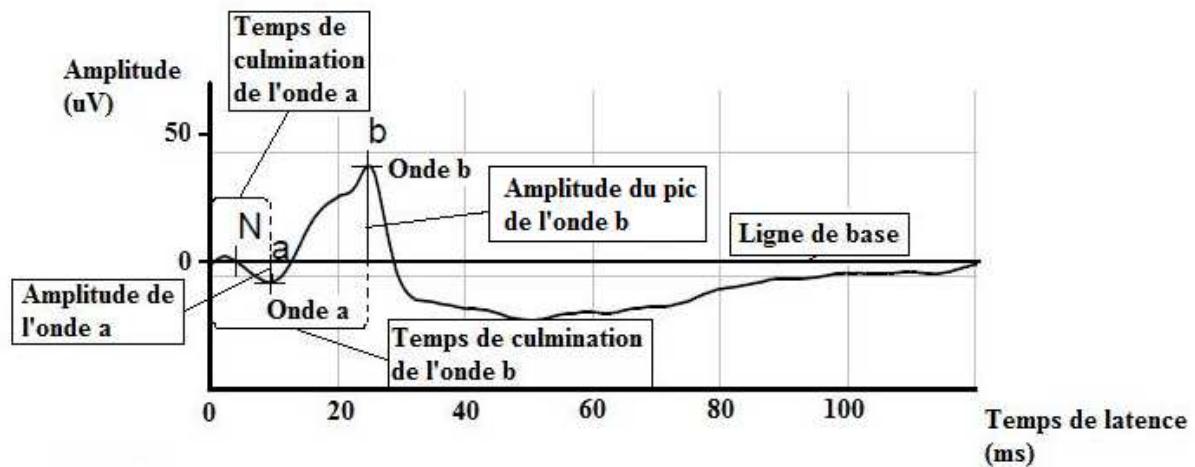
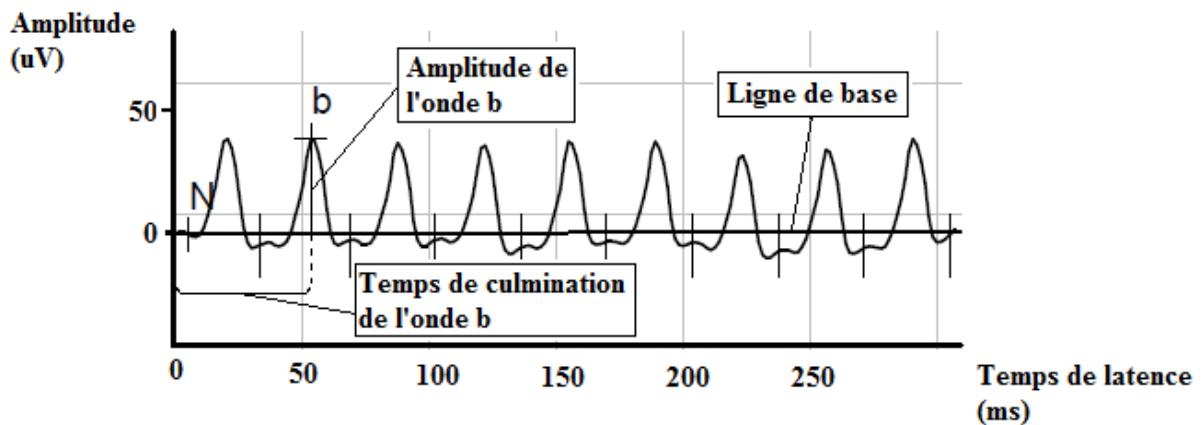


Figure 15 : Détermination des caractéristiques de l'onde a et b lors de la réponse de la rétine globale à plusieurs flashes lumineux, flicker. (ERG du chien H2F0725)



Source des figures 13 à 15 : Unité d'ophtalmologie, CHUVA, ENVA

### **III. Anomalies oculaires d'origine héréditaire chez le beagle**

Le beagle est une race originaire d'Angleterre et très ancienne. Les premiers beagles ont été introduits en France vers 1860. Le beagle est un chien courant mais il est très polyvalent, possède un très bon odorat, est de taille plutôt petite (33 cm à 40 cm de garrot), avec un bon tempérament. Le beagle est un chien à poils ras avec une robe tricolore (blanc, noir, fauve) ou bicolore (blanc et fauve vif ou citron et feu). Il est utilisé aussi bien comme chien de compagnie que comme chien de chasse, chien de détection ou chien de laboratoire. (22)

Les affections oculaires rencontrées dans la race beagle sont multiples. (*Tableau 1*)

*Tableau 1 : Affections oculaires héréditaires ou à prédisposition raciale chez le beagle (10)*

Affection	Mode de transmission	Commentaires
Microphtalmie	Autosomique dominant (avec anomalies oculaires multiples) ou inconnu	Elle peut être bilatérale ou unilatérale, accompagnée d'anomalies oculaires complexes (cataracte, dysplasie vitréenne multifocale)
	Autosomique récessif (unilatérale)	
Ectropion	Autosomique dominant (?)	Très rare
Distichiasis	Inconnu	De fréquence variable, il est rencontré plutôt à la paupière supérieure
Tumeurs palpébrales	Prédisposition raciale	Pas de base génétique
Luxation de la glande nictitante	Inconnu	Chez des chiens de moins d'un an (se développe entre 6 mois et 1 an) et elle serait héritable

Dystrophie cornéenne stromale lipidique	Inconnu	Elle est très fréquente (17% des chiens âgés de 5 à 15 ans, dont 75% atteints de façon bilatérale). L'opacité est grisâtre à blanchâtre localisée selon les formes entre le tiers antérieur et le tiers profond du stroma ; elle est typiquement ovale, horizontale, centrale. Il existe trois types en fonction de leurs aspects : type néphélion, type annulaire et type arqué. L'anomalie est en principe non invalidante et lentement évolutive
Kérato-conjonctivite sèche (KCS)	Inconnu	Chez des chiennes entre 6 et 8 ans avec une affection bilatérale et progressive
Persistante de la membrane pupillaire	Inconnu (peut être autosomique dominant)	Rare, uniquement des cas mineurs (fibres pupillaires en surélévation de la collerette, fibres irido-iriennes)
Kystes iriens	Inconnu	Fréquence pas très élevée, présente chez de chien d'au moins 8 ans

Glaucome primaire	Autosomique récessif	<p>Le glaucome à angle ouvert (rare chez le chien) est caractérisé par une élévation de la pression intra-oculaire chez des chiens âgés de 4 mois à 9 ans, avec une excavation pupillaire modérée et une désinsertion zonulaire entre 13 et 30 mois par fermeture progressive de la fente ciliaire au départ de structure normale. Les chiens glaucomateux (accès de glaucome aigu vers l'âge de 5 ans, buphtalmie et luxation du cristallin chez quelques chiens âgés de 7 ans ou plus) présentés pour traitement ne le sont pas avant 5 ans. Le gène myociline (MYO) est impliqué dans plus de 6% des glaucomes humains à angle ouvert, d'apparition précoce ou tardive, respectivement autosomiques dominant ou récessif. La myociline est une protéine présente sous forme glycosylée et non glycosylée dans l'humeur aqueuse ; elle est présente dans l'humeur aqueuse du beagle normal, sa concentration est environ multipliée par 4 chez les beagles porteurs et par 8 à 10 chez les beagles glaucomateux proportionnellement à la gravité de l'atteinte. Selon le laboratoire Optigen (<a href="http://www.optigen.com">www.optigen.com</a>), environ 1 % de la population de beagles serait porteuse de la mutation du gène ADAMTS10 (<i>A Disintegrin-like and A Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 motif 10</i>). Cette mutation est considérée comme responsable du glaucome à angle ouvert chez le beagle</p>
Cataracte :	Inconnu	<p>La cataracte sous capsulaire polaire postérieure triangulaire en principe bilatérale est décrite chez l'adulte, elle est rarement progressive. D'autres types de cataractes (capsulaire postérieure et antérieure, équatoriale, etc.) ont été sporadiquement observées</p>
Luxation du cristallin	Voir glaucome primaire	Elle est la conséquence du glaucome à angle ouvert

Dégénérescence des photorécepteurs (APR)	Autosomique récessif présumé	Les cas observés sont présentés pour cécité nocturne (éventuellement nocturne et diurne) entre 3 et 5 ans pour la plupart et de façon exceptionnelle entre 10 et 13 ans. L'hyperréflexion du tapis progresse et se généralise à partir d'une zone juxta-pupillaire en bande, horizontale, et de la périphérie du tapis. Les lésions focales claires de la zone sans tapis (nombreuses et fréquentes) sont ovales ou polyédriques
Dysplasie de la rétine	Autosomique récessif (?)	Il s'agit de plis rétiniens soit de la zone du tapis, soit de la zone sans tapis, linéaires ou ramifiés le plus souvent, parfois vermiformes. Ces plis persistent avec l'âge mais la fréquence (3% chez des chiens âgés de 3 à 6 mois) diminuerait avec l'âge et la localisation préférentielle est le quadrant inféro-nasal.
Hypoplasie et absence de tapis	Autosomique récessif (?)	Chez des chiens à iris clair (jaune ou fauve), le tapis est fréquemment absent (zone brun-rouge). La vascularisation choroïdienne est visible dans la zone sans tapis (dépigmentée). L'anomalie évolue dans le temps, la vascularisation choroïdienne devenant partout visible. La fréquence de l'anomalie serait de 1 cas pour 1500. Dans certains cas, le tapis est absent ou présent sous forme de simples îlots périphériques de petite taille. L'anomalie a été reconnue comme un défaut de développement d'origine autosomique récessive, sans incidence sur la vision. Le tapis est histologiquement visible mais ses éléments constitutifs sont irréguliers, remplis d'inclusions intracellulaires anormales visibles en microscopie électronique à transmission, carencés en zinc et en cystéine
Colobome du nerf optique	Inconnu	Rare, de dimension et de localisation variables
Hypoplasie du nerf optique	Inconnu	Rare (1 cas sur 1400). Il est associé au colobome. Les chiens affectés de façon bilatérale sont aveugles

Micropapille	Inconnu	Elle est liée à un défaut de myélinisation des fibres en arrière de la lame criblée et occasionnellement rencontrée dans la race
--------------	---------	--

## **IV. Recherche génétique appliquée à la couleur des yeux bleus chez le beagle**

Les gènes potentiellement responsables de la couleur des yeux ne sont pas connus chez le chien. Pour étudier un gène, il existe de nombreuses techniques dont l'approche « gène candidat » qui sera celle utilisée pour cette étude.

### **IV.1. Techniques génétiques utilisables pour l'identification de gènes d'intérêt**

Pour la recherche d'un gène potentiellement responsable d'un caractère phénotypique ou d'une maladie génétique, le généticien dispose d'outils et de cartes permettant de se repérer dans le génome, qui seront présentés ci-dessous.

#### **IV.1.1. Outils génétiques**

Pour notre étude, les principaux outils génétiques utilisés ont été des marqueurs génétiques de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) et la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Nous allons détailler leur utilisation.

##### ***IV.1.1.1. Les Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)***

Un SNP est une mutation ponctuelle isolée, c'est-à-dire qu'une seule base est différente, et en un seul locus. Il s'agit donc d'un polymorphisme nucléotidique. Le SNP correspond à une variation stable de la séquence génomique portant sur une base, toutes les 100 à 300 bases environ et affectant au moins 10% de la population chez l'homme. Les SNPs sont une nouvelle génération de marqueurs polymorphes qui n'ont en général pas d'implications fonctionnelles, mais qui définissent un locus unique dans le génome. Les SNPs situés dans les régions codantes et dans les régions régulatrices des gènes sont utilisés pour effectuer la cartographie des maladies multifactorielles qui consiste en l'étude d'association des gènes candidats impliqués dans ces maladies. Actuellement, ce sont les outils privilégiés dans l'exploration du génome canin. Chez le chien, il existe des « puces » à SNPs qui permettent de génotyper un animal pour plusieurs milliers de SNP, en une seule fois. On dispose ainsi d'une couverture régulière et dense du génome du chien, qui permet d'identifier des locus impliqués dans des maladies héréditaires ou des caractères d'intérêt. (3) (30) (42) (49)

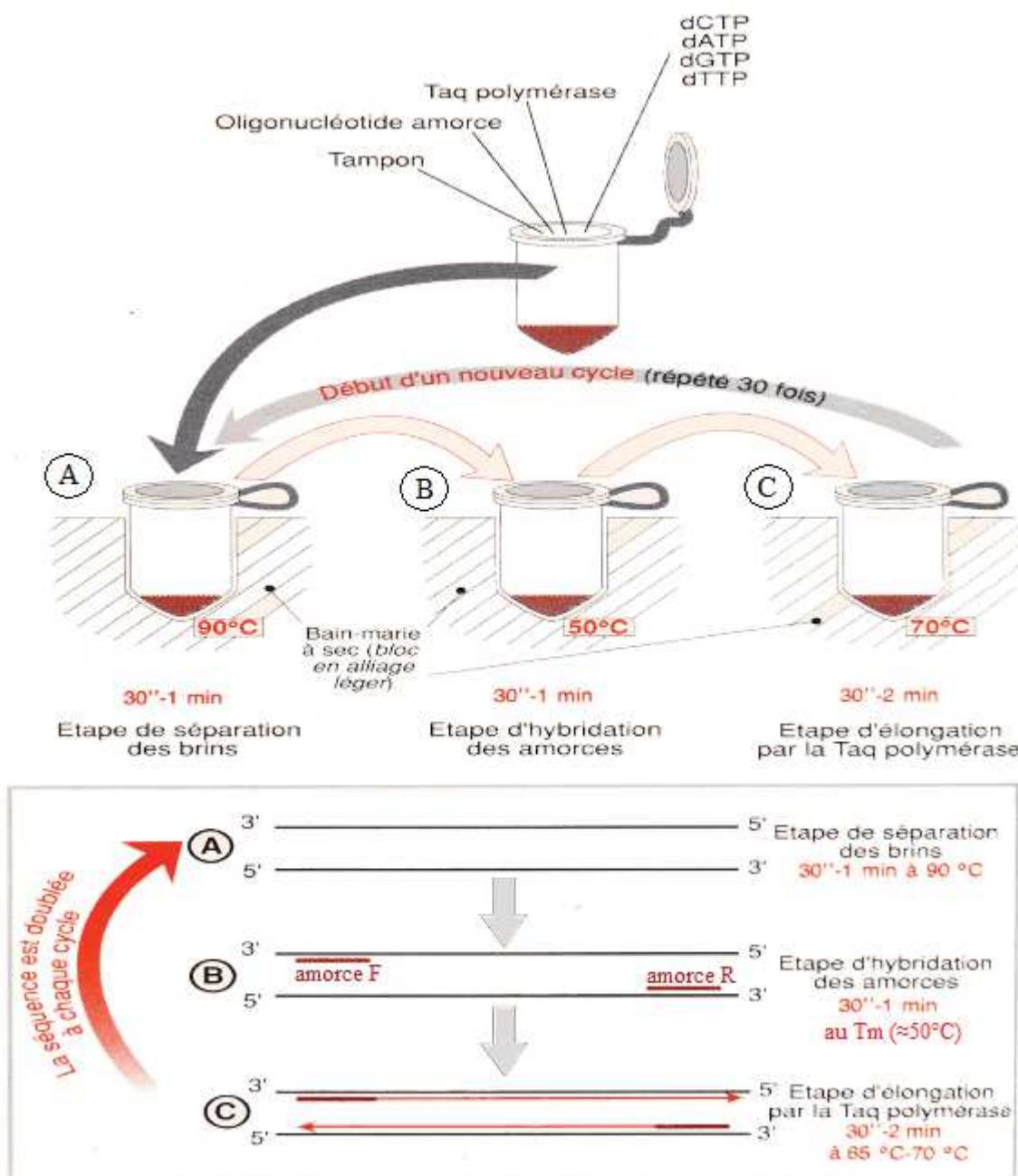
##### ***IV.1.1.2. La Polymerase Chain Reaction (PCR)***

La technique de PCR a été découverte en 1983 et mise au point en 1985 par K. Mullis. C'est une technique d'amplification *in vitro* qui utilise des ADN polymérasées (appelées Taq polymérasées : ce sont des enzymes thermostables) dont la particularité est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'une séquence qu'à partir d'une amorce. L'objectif de la PCR est de multiplier de façon exponentielle une séquence d'ADN choisie. La technique de PCR consiste à enchaîner plusieurs cycles décrits ci-dessous. Le nombre de copies d'ADN double à chaque cycle. (27)

Chaque cycle est composé de trois étapes décrites sur la *Figure 16* qui sont :

- **l'étape de séparation des brins d'ADN** (appelée phase A sur la *Figure 16*). Lors de cette étape, la température du bain-marie à sec augmente jusqu'à une température supérieure à 90°C (le plus souvent 94°C). C'est l'augmentation de la température qui est à l'origine de la séparation des brins d'ADN. On parle aussi de dénaturation de l'ADN ; (27)
- **l'étape d'hybridation** (appelée phase B sur la *Figure 16*) qui correspond à l'hybridation des amores *Forward* (F) et *Reverse* (R). Une amorce est une molécule d'ADN simple brin de 20 nucléotides environ qui encadre le morceau d'ADN que l'on souhaite amplifier. En effet, les amores ont un double rôle : celui de délimiter la séquence d'ADN choisie et de servir d'amorçage pour l'ADN polymérase avec leur extrémité 3' OH libre. Pour cela, il est nécessaire de connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. La composition des amores utilisées détermine la température d'hybridation des amores (*T<sub>m</sub>*). En général, elle est comprise entre 50 et 70°C. Le choix des amores est crucial dans la mise au point de la réaction PCR, pour cela il existe des logiciels d'analyse des séquences qui choisissent des amores ayant des conditions particulières (des séquences qui ne soient pas complémentaires entre elles, des séquences qui ne contiennent pas de séquences répétées inversées, des *T<sub>m</sub>* proches) ; (27)
- **l'étape d'elongation du brin complémentaire par la Taq polymérase** qui correspond à la phase C sur la *Figure 16*. Elle se déroule en général à 72°C et permet d'obtenir deux molécules d'ADN double brin ; (27)
- ces molécules d'ADN nouvellement formées vont subir un nouveau cycle. La PCR est composée de 30 à 35 cycles environ. Il n'est pas utile d'augmenter davantage le nombre de cycles car au-delà d'une trentaine de cycles, le nombre de copies n'augmente plus. (27)

Figure 16 : Principe de réalisation pratique d'une PCR (d'après (27))



La PCR permet la multiplication exponentielle d'une séquence d'ADN déterminée par les amorce. En phase A, l'augmentation de la température permet la séparation des brins d'ADN. Lors de la phase B, les amorces F et R s'hybrident. Au cours de la phase C a lieu l'elongation par la Taq polymérase, qui permet d'obtenir deux molécules d'ADN double brin qui vont subir un nouveau cycle. Une trentaine de cycles environ s'enchaînent.

Pour effectuer ces trois étapes qui nécessitent des transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies pendant

des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (1 à 2 heures pour une PCR de 30 cycles).

A la fin de la PCR, pour vérifier qu'elle a bien fonctionné, le produit est visualisé en utilisant généralement une électrophorèse en gel d'agarose. Les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille par l'action d'un champ électrique. Un agent intercalant est utilisé pour visualiser les différents fragments d'ADN sous lumière ultraviolette. (27)

La PCR est utilisée pour toutes sortes d'applications : amplification d'un segment d'ADN pour divers usages (clonage cellulaire, séquençage), détection des délétions d'insertions, détection du polymorphisme des minisatellites et microsatellites, génération de sondes (radioactives, fluorescentes),... Elle est très souvent utilisée en génétique malgré l'existence de plusieurs limites : la taille de la séquence à amplifier doit être inférieure à 3kb (kilobases) avec une Taq conventionnelle, l'inefficacité de l'augmentation du nombre de cycles au-delà d'une trentaine, la contamination de l'ADN lors de manipulations (pour diminuer l'impact de ces contaminations, il est important de manipuler dans de bonnes conditions et de limiter au maximum les possibilités de transfert d'ADN en suspension dans l'air ou transmis par le manipulateur), le manque de fidélité de la Taq polymérase et des amplifications parasites (mauvaise hybridation des amorces qui sont de courte taille). (27)

Pour notre étude la PCR fut utilisée pour amplifier un segment d'ADN en vue de le séquencer.

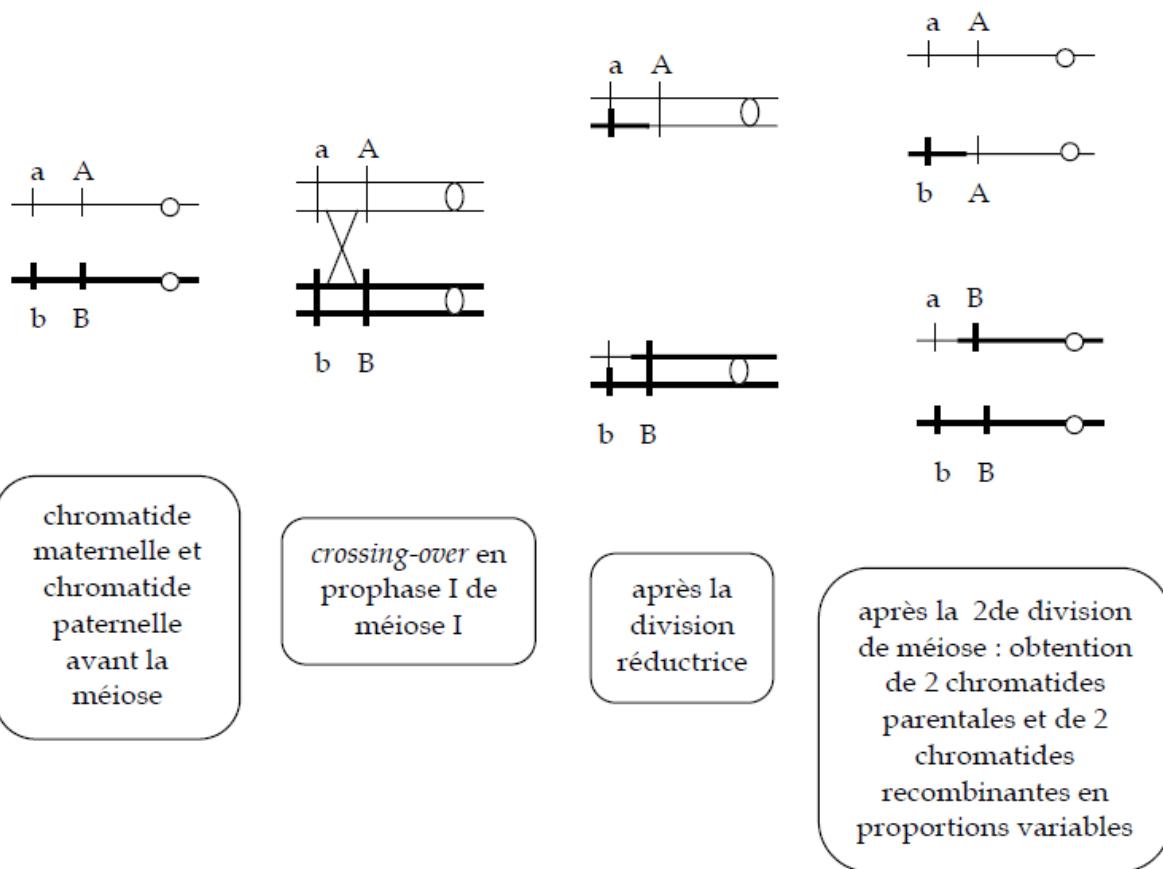
## IV.1.2. Cartographie

La cartographie est la localisation des gènes et marqueurs génétiques ou segments d'ADN sur les chromosomes. Elle permet de se repérer dans le génome et de pouvoir étudier les gènes s'y trouvant. Il existe de nombreuses manières de faire des cartes du génome, dont les cartes génétiques, les cartes physiques et le séquençage, décrites ci-dessous.

### IV.1.2.1. Cartes génétiques

La réalisation d'une carte génétique consiste à localiser des marqueurs génétiques (SNP, microsatellites) d'une espèce les uns par rapport aux autres. Pour cela, on analyse statistiquement la capacité des marqueurs à se réassocier à la suite du brassage des chromosomes (*crossing-over*) qui se produit pendant la méiose. (*Figure 17*). Lorsque deux marqueurs ségrégent ensemble, ils sont liés et lorsque deux marqueurs ségrégent séparément, ils sont indépendants (*Figure 18*). La cartographie génétique est fondée sur le principe que deux marqueurs situés sur le même chromosome maintiennent d'autant plus fréquemment leur liaison après la méiose que la distance physique les séparant est faible. Ainsi la distance génétique sur une carte de liaison est déterminée par la fréquence des *crossing-over*. Plus les locus sont proches, plus les chances de recombinaisons méiotiques sont faibles ; et inversement, plus les locus sont éloignés et plus les chances de *crossing-over* sont élevées. Plus deux locus sont proches, moins il y a de chance qu'un *crossing-over* se produise et plus le nombre de gamètes recombinants est faible. (27)

Figure 17 : Crossing-over lors de la méiose (27)



*a/b* : allèles du gène 1

*A/B* : allèles du gène 2

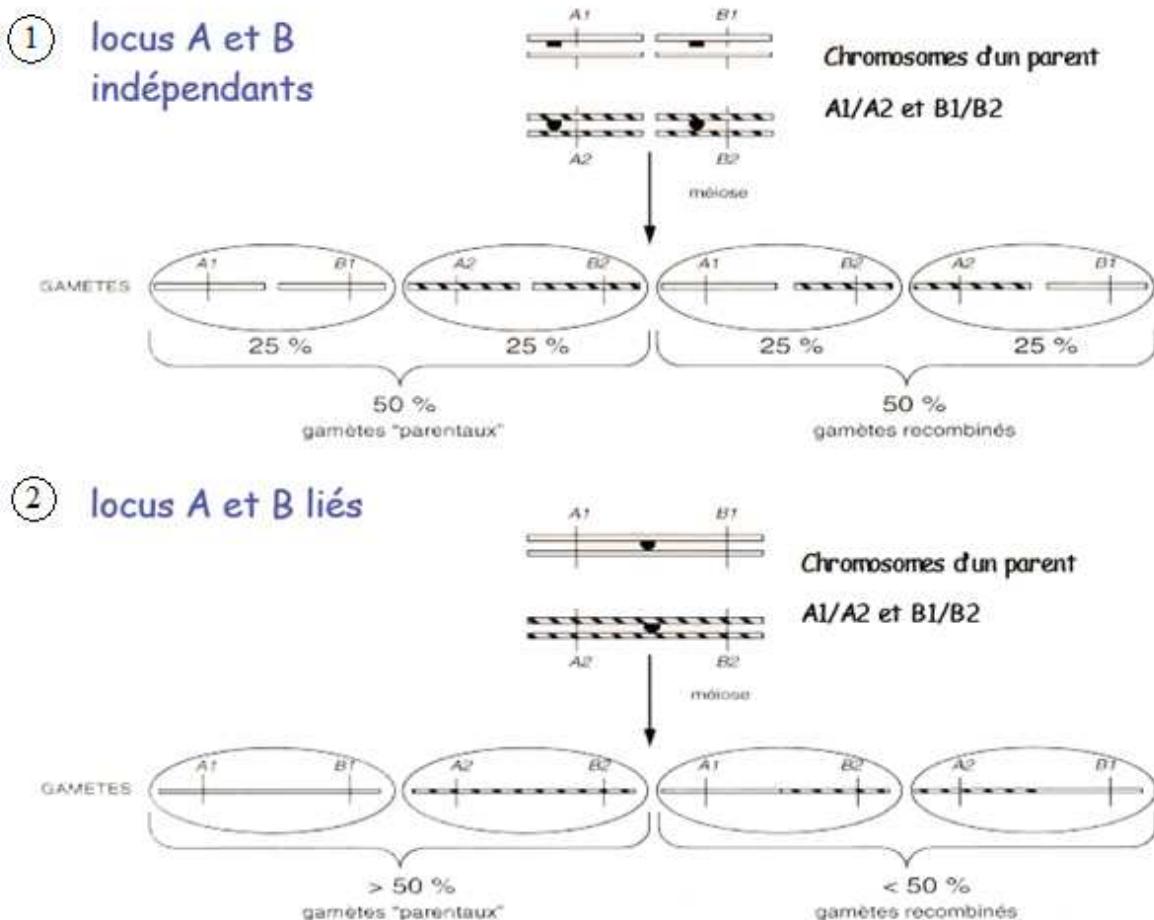
*a* et *A* appartiennent au chromosome maternel.

*b* et *B* appartiennent au chromosome paternel.

Sur cette figure, un seul chromosome est représenté. Son centromère est représenté par un cercle.

Lors de la première division de méiose, les chromosomes homologues s'apparentent. À cette occasion, se produisent les crossing-over. Un échange de segments de chromatide *a* alors lieu. À la fin de la seconde division de méiose, on obtient 4 chromatides que l'on peut classer en 2 catégories : deux chromatides parentales, l'une paternelle portant *b* et *B*, l'autre maternelle portant *a* et *A*, et deux chromatides recombinantes portant les allèles *b* et *A* pour l'une, *a* et *B* pour la seconde.

Figure 18 : Liaison génétique et recombinaison (d'après(23) )



Soit deux locus A et B. Le locus A possède deux allèles A1 et A2. Le locus B possède deux allèles B1 et B2. Dans la partie 1, le locus A et B sont sur des chromosomes différents et sont donc indépendants. La moitié des gamètes produits est de type parental et l'autre moitié des gamètes est de type recombiné. Dans la partie 2, les locus A et B sont sur le même chromosome et sont donc liés. Plus de 50 % des gamètes est de type parental et moins de 50 % est de type recombiné.

Lors de la méiose, les individus parents donnent naissance à des individus enfants parmi lesquels on trouve des recombinants (ou recombinés) et des parentaux. Cette nouvelle génération voit l'apparition de nouvelles combinaisons d'allèles présents sur une même chromatide. La proportion d'enfants recombinants définit la fraction (ou fréquence) de recombinaison entre les deux locus appelée  $\theta$ .

$$\theta = \frac{\text{nombre de recombinants}}{(\text{nombre de recombinants} + \text{nombre de parentaux})}$$

La distance génétique exprimée en centiMorgan (cM) se calcule à partir de  $\theta$ . Un cM équivaut à un segment de chromatide sur lequel la probabilité qu'un crossing-over se produise est de 1%. (23) (27)

La carte génétique est établie grâce à la position relative des gènes et des marqueurs sur les chromosomes, mais elle ne permet pas de connaître la distance physique exacte séparant deux locus. En effet, malgré une fréquence de recombinaison nulle ou très proche de zéro, il est possible que plusieurs milliers de bases séparent deux locus. (23) (27)

Chez le chien, des cartes génétiques ont été établies, qui ont permis d'identifier des gènes responsables de caractères délétères et d'intérêt. (38)

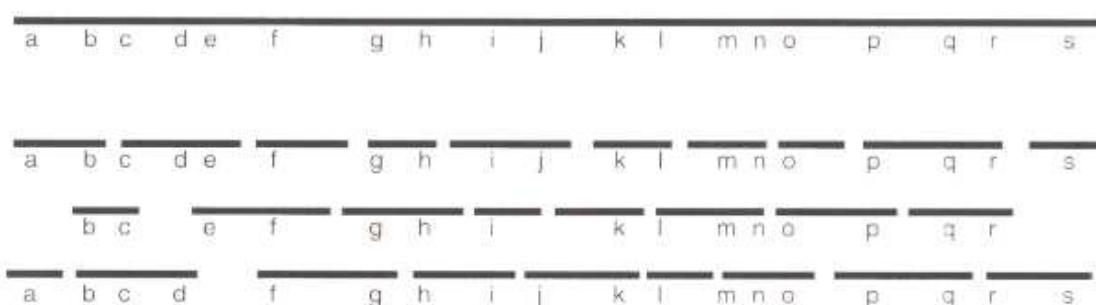
#### **IV.1.2.2. Carte physique**

La carte physique d'une espèce représente les chromosomes de cette espèce reconstitués artificiellement à l'aide d'une succession de clones d'ADN (morceaux d'ADN clonés c'est à dire multipliés artificiellement) et chevauchants. Les clones d'ADN sont obtenus à l'aide de l'ADN génomique de l'espèce considérée, fractionnés et inclus dans des vecteurs (de type plasmides, BAC : *Bacterial Artificial Chromosome*, ou YAC : *Yeast Artificial Chromosome*) que l'on utilise pour multiplier les clones d'ADN dans des systèmes bactériens ou en levures. Dans un second temps, il faut déterminer l'ordre des clones par l'identification des zones de chevauchement. Le positionnement des clones les uns par rapport aux autres fait appel à différentes techniques, dont le point commun est de rechercher les parties communes entre différents clones. (23) (27)

Parmi ces techniques, on peut citer :

- **l'hybridation des clones entre eux** : si deux clones peuvent s'hybrider, c'est qu'ils possèdent des séquences communes ;
- **typage de clones par PCR** pour déterminer la présence des marqueurs STS (*Sequence Tagged Sites*). Les STS sont de courtes séquences représentées de façon unique dans le génome. Si deux clones sont partiellement chevauchants c'est qu'ils contiennent un même marqueur unique. Les clones sont testés en PCR avec un marqueur donné et on regarde s'il y a présence ou non du STS ; (*Figure 19*)

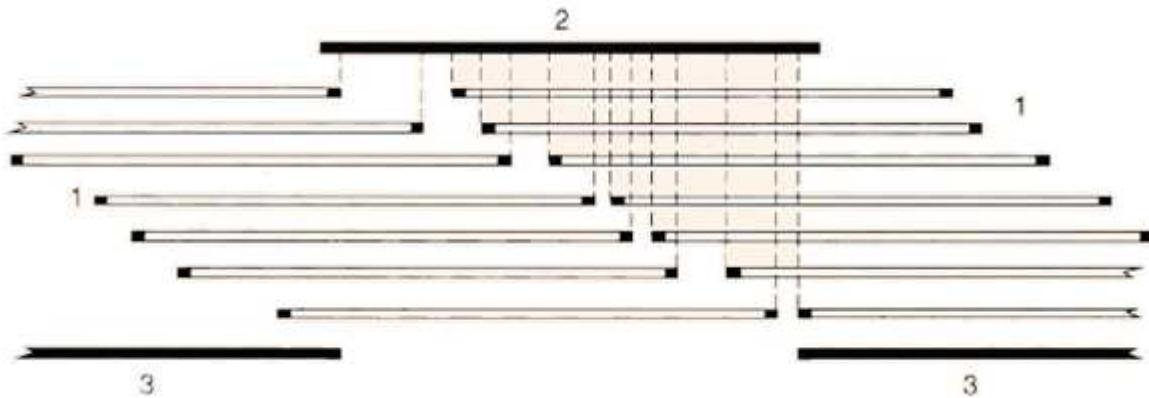
*Figure 19 : Établissements d'une carte physique de fragment chevauchants à l'aide de STS (d'après (20))*



*Les fragments clonés sont analysés pour la présence ou l'absence d'un ensemble de STS. Des clones ayant un ou plusieurs STS en commun sont chevauchants. On peut souvent déduire l'ordre des STS et donc celui des clones à partir du contenu en STS des clones.*

- **séquençage des extrémités** : certains clones sont séquencés en entier et les autres n'ont que leurs extrémités de séquencées. Les clones séquencés partiellement sont repositionnés en fonction du clone totalement séquencé. (*Figure 20*) (20)

*Figure 20 : Séquençage des extrémités (d'après (20))*



*Les rectangles noirs représentent les segments d'ADN séquencés. Les rectangles blancs représentent les segments d'ADN non séquencés et qui sont ordonnés en fonction de leurs extrémités séquencées (carré noir).*

Ainsi, les groupes de grands clones chevauchants sont positionnés le long des chromosomes ainsi reconstitués. Une fois tous les grands clones ordonnés et positionnés le long du génome, on dispose d'une carte physique de la région du génome étudiée, voire du génome complet étudié. (20) (23) (27)

#### *IV.1.2.3. Les cartes d'hybrides d'irradiation*

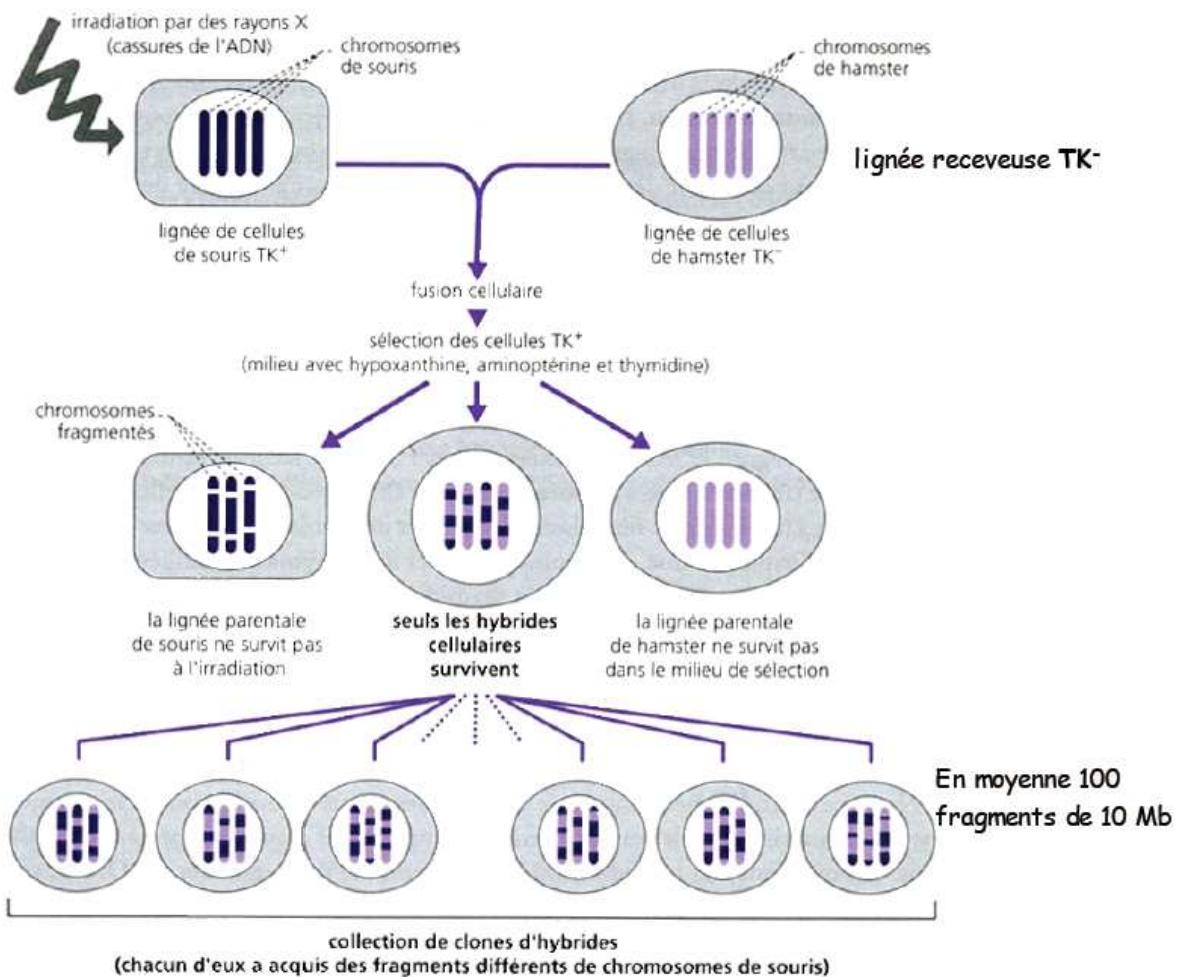
Les cartes d'hybrides d'irradiation reposent sur la fréquence d'apparition de cassures chromosomiques induites artificiellement par des rayons X, observées sur des cellules hybrides. Un hybride d'irradiation est une cellule fusionnée entre une cellule lourdement irradiée de l'animal que l'on veut cartographier et d'une cellule d'un autre animal (généralement de rongeur). Deux marqueurs initialement localisés à proximité l'un de l'autre ont plus de chance d'être simultanément retrouvés dans les mêmes hybrides que deux marqueurs éloignés. (24)

Les distances se mesurent en centiray (cR). Par définition, 1 cR<sub>(N rad)</sub> correspond à une fréquence de cassure de 1 % entre deux locus après exposition à une dose de N rad de rayons X. Une correspondance peut être établie avec les distances de cartes physiques et génétiques : 1cR pour 3000 rad équivaut environ à 200 kb, et 1cR pour 9000 rad équivaut environ à 55 kb. Ainsi, plus la dose d'irradiation (rayons X) appliquée est grande, plus la fragmentation sera élevée et plus la résolution de la carte sera fine. (24)

Les étapes de la cartographie d'hybrides d'irradiation sont :

- la **fabrication de panels d'hybrides d'irradiation** (*Figure 21*). Une collection de 100 à 200 hybrides d'irradiation est suffisante pour obtenir une carte au cR 3000 ; (24) (25) (43)

*Figure 21 : Fabrication des hybrides d'irradiation (27)*

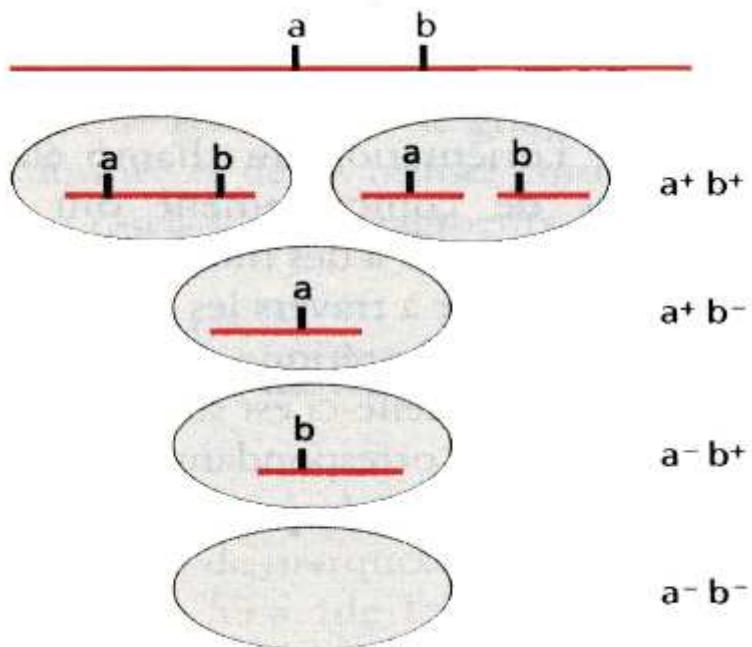


Lorsque la lignée des cellules de l'animal que l'on veut cartographier est irradiée, l'irradiation crée des cassures dans l'ADN des cellules. Ensuite, ces cellules sont fusionnées avec des cellules de hamsters déficients en thymidine kinase (TK). Puis elles sont mises dans un milieu de sélection où seuls les hybrides cellulaires (possédant le gène de la thymidine kinase) survivent. Ceci permet d'obtenir une collection d'hybrides où chacun d'entre eux possède un assortiment de fragments de chromosome de l'animal, inclus dans les chromosomes de hamster.

- chaque locus (marqueur, gène) peut être recherché en PCR à partir de l'ADN de chaque clone du panel d'hybrides. Ainsi, la fréquence de présence et d'absence de différents marqueurs moléculaires de l'animal de départ est calculée chez les hybrides. Les marqueurs n'ont pas besoin d'être polymorphes, seul la présence d'un signal positif en PCR (amplification du locus) ou négatif (pas d'amplification du locus) est analysée ; (24) (25) (43)

- l'analyse utilise une méthode statistique : la fréquence de la présence simultanée de deux locus est calculée et comparée aux fréquences de chaque locus présent individuellement. Les locus étroitement liés car physiquement proche au départ sur le chromosome de l'animal étudié sont incorporés ensemble à des fréquences élevées dans les hybrides car la probabilité qu'une irradiation par rayons X induise une cassure entre les deux locus est faible. Inversement pour des locus éloignés les uns des autres ou situés sur des chromosomes différents, ils ont peu de chances d'être présents simultanément dans un grand nombre d'hybrides. Cette technique repose donc sur l'analyse simultanée d'une collection (panel) d'hybrides contenant au minimum une centaine de clones. (*Figure 22*) (24) (25) (43)

*Figure 22 : Différents clones d'hybrides obtenus (27)*



*Les différents clones d'hybrides obtenus sont [*a*<sup>+</sup>*b*<sup>+</sup>], [*a*<sup>+</sup>*b*<sup>-</sup>], [*a*<sup>-</sup>*b*<sup>+</sup>] et [*a*<sup>-</sup>*b*<sup>-</sup>]. En fonction de la fréquence de [*a*<sup>+</sup>*b*<sup>+</sup>] par rapport à [*a*<sup>+</sup>*b*<sup>-</sup>] et [*a*<sup>-</sup>*b*<sup>+</sup>], les deux locus *a* et *b* sont liés ou non. Si la fréquence des clones [*a*<sup>+</sup>*b*<sup>+</sup>] est très supérieure à [*a*<sup>+</sup>*b*<sup>-</sup>] et [*a*<sup>-</sup>*b*<sup>+</sup>] alors les locus sont liés.*

La cartographie d'hybride d'irradiation permet de cartographier des locus polymorphes et non polymorphes, de disposer de l'ADN des clones de façon illimitée (culture cellulaire) et une résolution très élevée par rapport à la cartographie génétique. (25) (43)

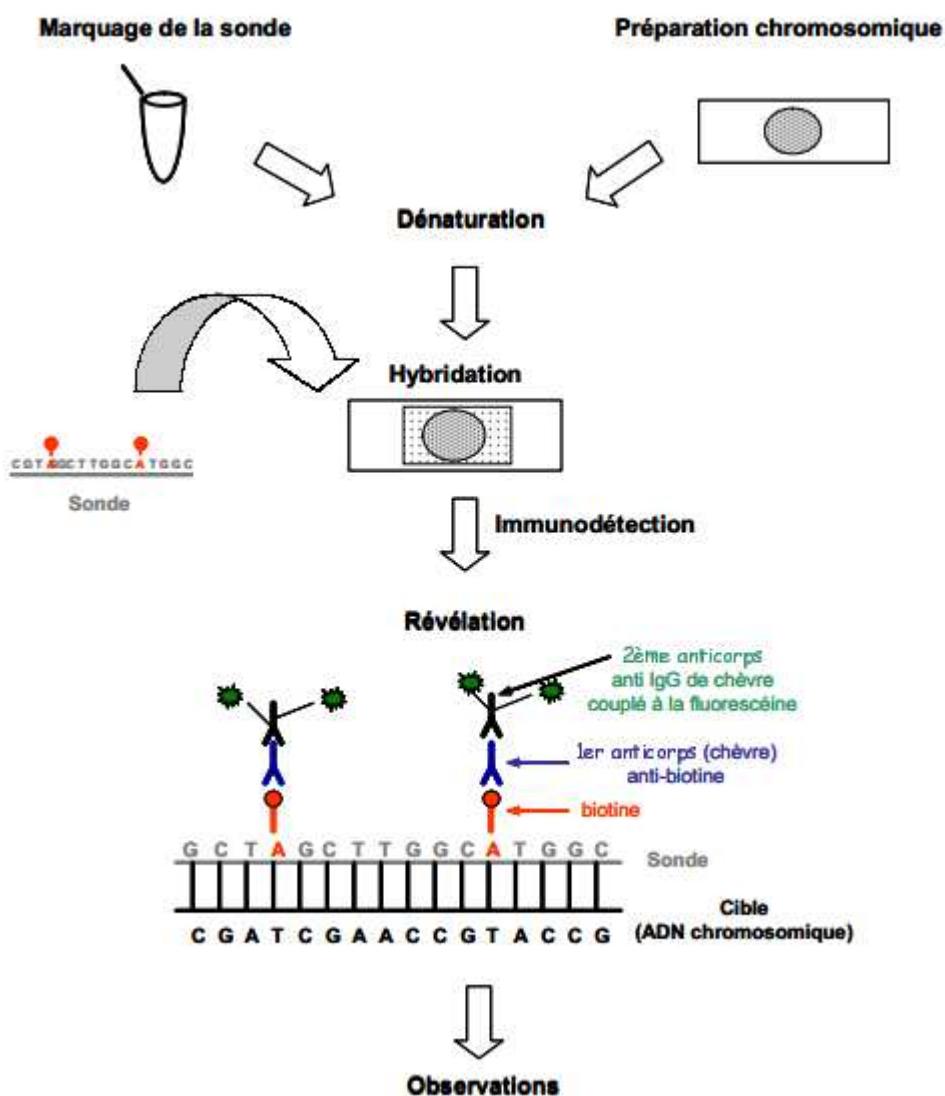
#### ***IV.1.2.4. Cartes cytogénétiques et cartes comparatives***

Les cartes cytogénétiques sont obtenues à partir de l'étude des chromosomes. Elles correspondent aux profils de bandes observables au microscope sur des étalements de chromosomes après coloration. Les chromosomes sont étudiés au cours du stade du cycle cellulaire où les chromosomes sont bien individualisés et observables au microscope : la métaphase mitotique. (11) (24)

Il existe différentes techniques de cytogénétiques qui sont :

- le *banding* (établissement du caryotype), il s'agit d'une coloration des chromosomes formant des bandes et permettant de les reconnaître ;
- l'hybridation *in situ* radioactive ou fluorescente sur chromosomes : elle permet d'identifier une portion chromosomique dont la séquence en bases est très homologue à celle d'un acide nucléique marqué appelé sonde. Dans la technique FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), la sonde est marquée par l'incorporation de nucléotides modifiés obtenus par liaison covalente d'une molécule rapporteuse qui se liera par la suite avec une molécule fluorescente. Les chromosomes colorés sont regardés au microscope et permettent de situer la sonde dans le caryotype. L'utilisation de plusieurs sondes simultanément permet de réaliser une peinture chromosomique. (*Figure 23 et Figure 24*) (11)

Figure 23 : Principe de l'hybridation *in situ* sur chromosomes (FISH) (11)



Dans cet exemple, la sonde est marquée par incorporation de biotine-14-dATP, puis hybridée sur une préparation chromosomique. Le signal d'hybridation est révélé par immunofluorescence indirecte avec deux anticorps : le premier est un anticorps IgG (immunoglobuline G) de chèvre anti-biotine, le deuxième est un anticorps anti-IgG de chèvre couplé à la fluorescéine.(11)

*Figure 24 : Résultat d'une hybridation sur des chromosomes de chien (59)*



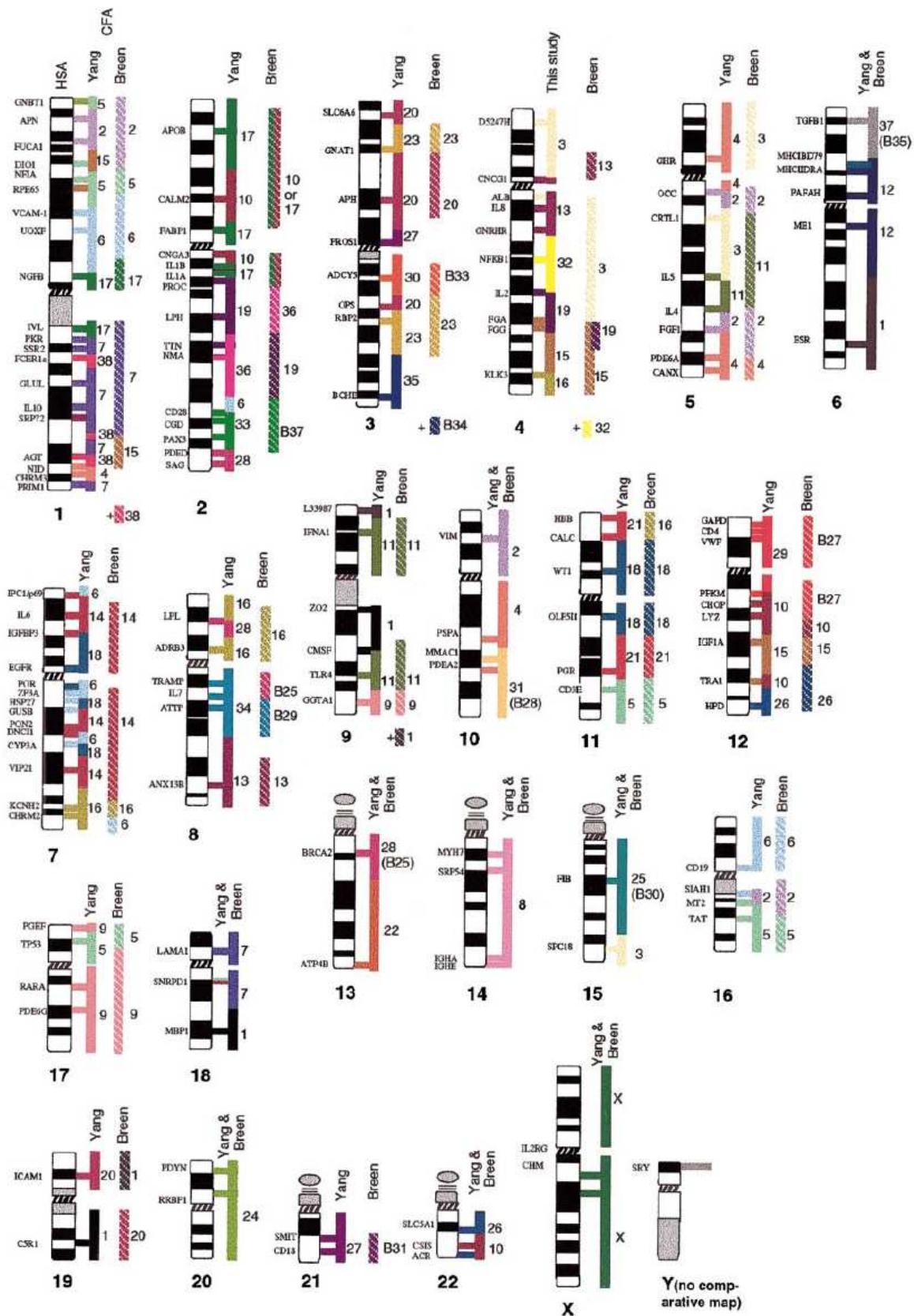
*Cet exemple nous montre une photo de l'hybridation du chromosome 3 humain sur 5 paires de chromosomes canins (signal rouge).*

La cytogénétique a également comme autres utilisation que de cartographier des gènes ou portions d'ADN sur les chromosomes, l'étude d'anomalies chromosomiques, des syndromes microdélétionnels, de translocations, ou la cartographie comparée entre deux espèces. (4) (46) (58) (59)

La cartographie comparée consiste à déterminer les régions chromosomiques homologues conservées dans plusieurs espèces. L'identification de ces régions permet de transposer des connaissances d'une espèce bien connue à une autre espèce moins connue ce qui facilite le l'identification de gènes impliqués dans des caractères délétères ou d'intérêt. De plus elle permet d'étudier l'évolution des génomes. La cytogénétique comparée consiste à hybrider des sondes d'ADN fluorescentes d'une première espèce, sur les chromosomes d'une autre espèce ; cette technique est appelée Zoo-FISH. (4) (7) (11) (46) (58) (59)

Chez le chien, plusieurs cartes cytogénétiques comparées avec l'homme ont été effectuées, dont celles établies par Yang et Breen (*Figure 25*). (4) (7) (46) (58) (59)

*Figure 25 : Carte comparative entre l'homme et le chien (46)*

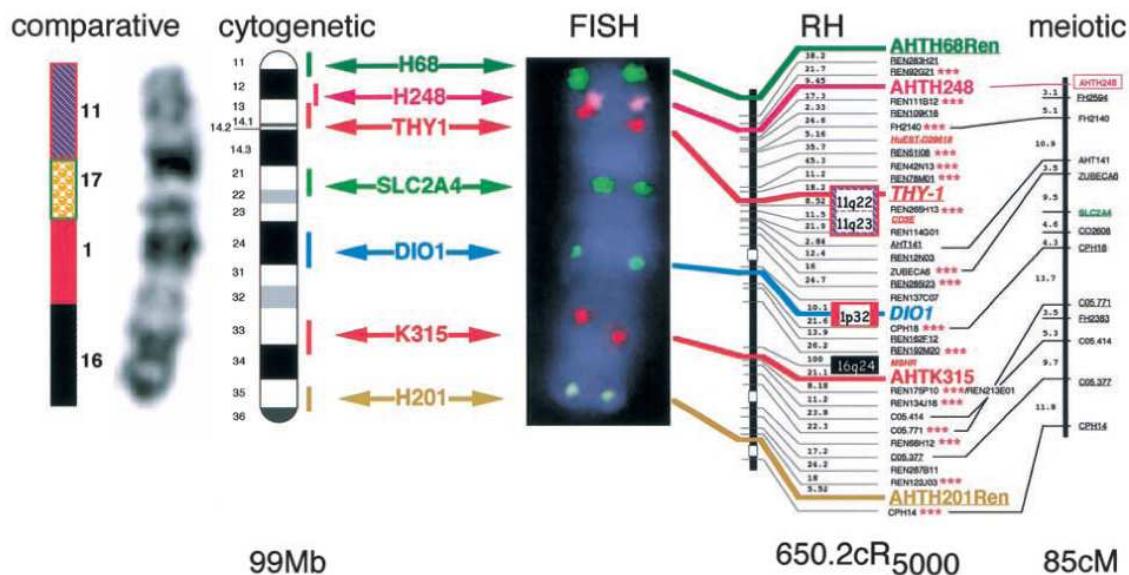


Cette carte comparative représente les chromosomes humains à gauche avec leurs bandes et à droite en couleur les chromosomes canins d'après les cartes de Yang et Breen. (46)

#### IV.1.2.5. Cartes intégrées

Les cartes intégrées sont la compilation des cartes cytogénétiques (ou chromosomiques), des cartes génétiques (indiquant les positions relatives des locus grâce aux fréquences des événements de recombinaison méiotiques), des cartes d'hybrides d'irradiation (indiquant la position relative de locus grâce aux fréquences de cassures chromosomiques dues aux rayons X) et des cartes physiques (ensembles ordonnés de clones d'ADN). Les unités de distances entre ces cartes sont différentes, ainsi une correspondance entre les cartes doit être établie, en fonction des locus présents simultanément sur les différentes cartes. Par exemple, Breen *et al.* ont établi une carte intégrée de tous les chromosomes du chien en intégrant les cartes d'hybrides d'irradiations et les cartes de liaison, avec les cartes cytogénétiques (en banding et en FISH), (Figure 26). (5) (6) (35)

Figure 26 : Carte intégrée du chromosome 5 canin (CFA 5) (6)



La carte intégrée indique la correspondance entre la carte d'hybrides d'irradiation (RH), la carte de liaison (meiotic = méiose), la carte cytogénétique en banding (cytogenetic = cytogénétique) et en FISH et la carte comparative avec l'homme. Six clones (*H68*, *H248*, *THY1*, *DIO1*, *K315* et *H201*) ont été sélectionnés à partir de leur position le long de la carte d'hybride d'irradiation et sont indiqués en texte coloré. Le septième clone (*SLC2A4*) a été sélectionné sur la carte de liaison. Chacun des 7 clones ont été marqués par un fluorochrome différent et a été hybride par la technique de FISH sur le chromosome 5 canin. Le résultat du FISH est montré au centre de la figure. Sur la gauche de la figure sont représentées les bandes du chromosome 5 (cytogenetic = cytogénétique) et à l'extrême gauche les correspondances avec les segments chromosomiques humain conservés (carte comparée = comparée). (6)

Les cartes intégrées sont utiles par exemple :

- pour établir des listes de gènes candidats pour un caractère étudié dans une espèce dont le génome est mal connu, de part leur position grâce aux synténies conservées entre deux espèces ;

- pour définir des régions candidates lors d'une approche de type clonage positionnel (voir après) ;
- pour fournir une couverture complète du génome à l'aide de marqueurs génétiques, avec des distances entre marqueurs qui soient faibles ;
- pour faciliter le clonage de gènes d'intérêt. (5) (6) (35)

#### ***IV.1.2.6. Le séquençage du génome du chien***

Le génome du chien est composé de 38 paires de chromosomes autosomes et d'une paire de chromosomes sexuels (X et Y). Le séquençage du génome du chien a été finalisé en 2005 et il a été réalisé à partir de l'ADN d'un boxer femelle. La taille totale du génome canin est de 2,41 Giga bases (Gb). Il s'est révélé plus petit que celui de l'homme (2,9 Gb). Cela s'explique par un plus faible pourcentage de séquences répétées dans le génome canin (31% dans le génome canin, 46% chez l'homme, et 38% chez la souris) (334 Mb versus 609 Mb pour l'homme). (14) (32) (42) (56)

En revanche, il existe un cas particulier d'éléments répétés appartenant à la famille des SINE (*short interspersed nuclear element*) particulièrement abondants chez le chien. Les SINE correspondent à des éléments rétrotransposables d'environ 200 pb (paire de bases) et représentent environ 7% du génome du chien (environ 11000 SINE polymorphes). Ils sont très actifs par comparaison à l'homme où le nombre d'insertions bimorphiques de SINE est inférieur à 1 000. L'insertion d'un SINE dans un exon ou dans une séquence régulatrice peut considérablement modifier le transcrit ou la régulation du gène. De la même façon, l'insertion anti-sens d'un SINE dans un intron peut engendrer une modification du mécanisme d'épissage en créant un nouveau site accepteur. Il a été montré que les SINE jouent un rôle important dans la diversification morphologique ou dans les maladies génétiques chez le chien. (14) (42)

Lors du séquençage en 2005, 19300 gènes pour le chien ont été prédits, ces gènes sont disponibles dans la base de données génomiques Ensembl (19) . Le nombre de gènes prédit chez le chien est inférieur à celui d'autres espèces telles que l'homme avec 22320 gènes ou la souris avec 23062 gènes. (14) (32) (42)

De plus, au moins 650 Mb de séquences d'ADN du génome canin coïncideraient de façon unique avec des séquences du génome humain, avec notamment près de 18500 fragments de gènes orthologues entre les gènes canins et humains, ce qui confirme l'intérêt que suscite l'espèce canine comme modèle en génétique. (14) (30) (42)

La comparaison du séquençage du boxer et du caniche et du séquençage à faible couverture de 9 autres races de chiens et de loups a permis de cataloguer plus de 2,5 millions de marqueurs génétiques de type SNP permettant une meilleure identification des locus gouvernant des phénotypes d'intérêt. (3) (14) (42) (49)

La connaissance de l'organisation du génome est essentielle pour effectuer des analyses génétiques plus poussées en vue de l'identification de gènes responsables de maladies héréditaires ou de caractères d'intérêt tels des phénotypes morphologiques. L'étude

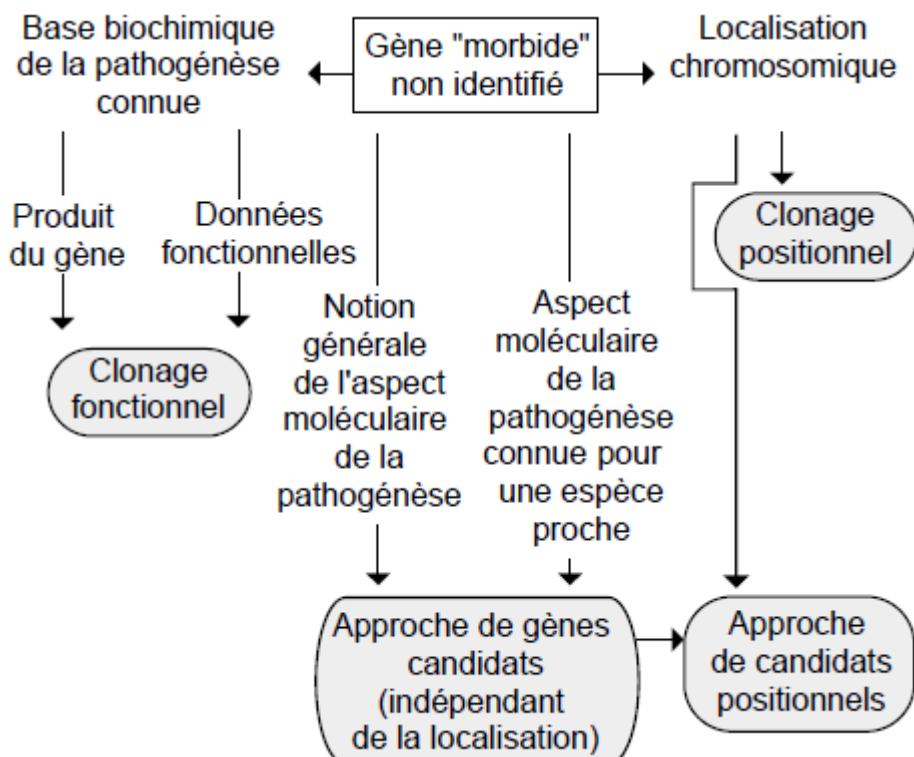
génomique comparative entre le chien et l'homme peut également permettre d'identifier des gènes d'intérêt. (49) (53)

Ainsi, les outils de cartographie permettent d'identifier des gènes impliqués dans des caractères d'intérêt. Dans cette étude, le séquençage du génome du chien nous a permis de comparer des gènes humains et leurs homologues canins afin d'identifier et d'étudier les gènes potentiellement responsables de la couleur bleue des yeux de nos chiens beagle. La technique utilisée dans cette étude pour tenter d'identifier le gène responsable du caractère yeux bleus est décrite ci-après.

#### IV.1.3. Stratégies d'identification de gènes chez le chien

Il existe plusieurs méthodes pour identifier un gène dont la mutation est responsable d'une maladie génétique ou d'un caractère phénotypique (*Figure 27*). Parmi ces méthodes, la technique du clonage fonctionnel, fondée sur la biochimie, utilise des indications sur la nature ou la fonction de la protéine défective et permet de remonter au gène présentant une anomalie. La cytogénétique peut également être utilisée. En effet, l'observation des chromosomes peut révéler des anomalies de type délétion ou translocation qui sont susceptibles d'orienter vers une région précise du génome. Cependant, les deux approches les plus utilisées chez le chien sont l'approche gène candidat et le clonage positionnel ; celles-ci sont décrites ci-dessous. (18) (23) (27) (28) (55)

*Figure 27 : Stratégie d'identification de gène (18)*



L'approche gène candidat est la technique utilisée dans la partie expérimentale de ce travail.

#### **IV.1.3.1. Clonage positionnel (23) (27) (28)**

Le clonage positionnel est une méthode d'identification de gènes fondée uniquement sur la localisation du gène sur les chromosomes. Il est basé sur les techniques de cartographie et de séquençage.

La première étape consiste à recenser les familles ou des cohortes dans lesquelles des individus sont atteints par la maladie ou le caractère étudié et à récolter leur ADN.

La deuxième étape est celle de la carte génétique. Elle vise à effectuer le génotypage de plusieurs centaines ou milliers de marqueurs (microsatellites ou SNP respectivement) répartis à intervalles réguliers sur l'ensemble des chromosomes de tous les individus recensés. Cette opération est nommée criblage du génome dans la littérature francophone et *genome scan* dans la littérature anglo-saxonne. Le principe consiste à utiliser des marqueurs de l'ADN suffisamment proches du gène que l'on cherche pour que la probabilité de recombinaison entre eux soit faible. On peut ainsi identifier les marqueurs dont les allèles ségrégent spécifiquement avec l'allèle responsable du caractère. Ils définissent une région sur l'un des chromosomes, appelée intervalle candidat. L'objectif est alors de multiplier le nombre (densifier) de marqueurs dans cette région afin d'affiner l'intervalle et d'approcher au plus près le gène incriminé.

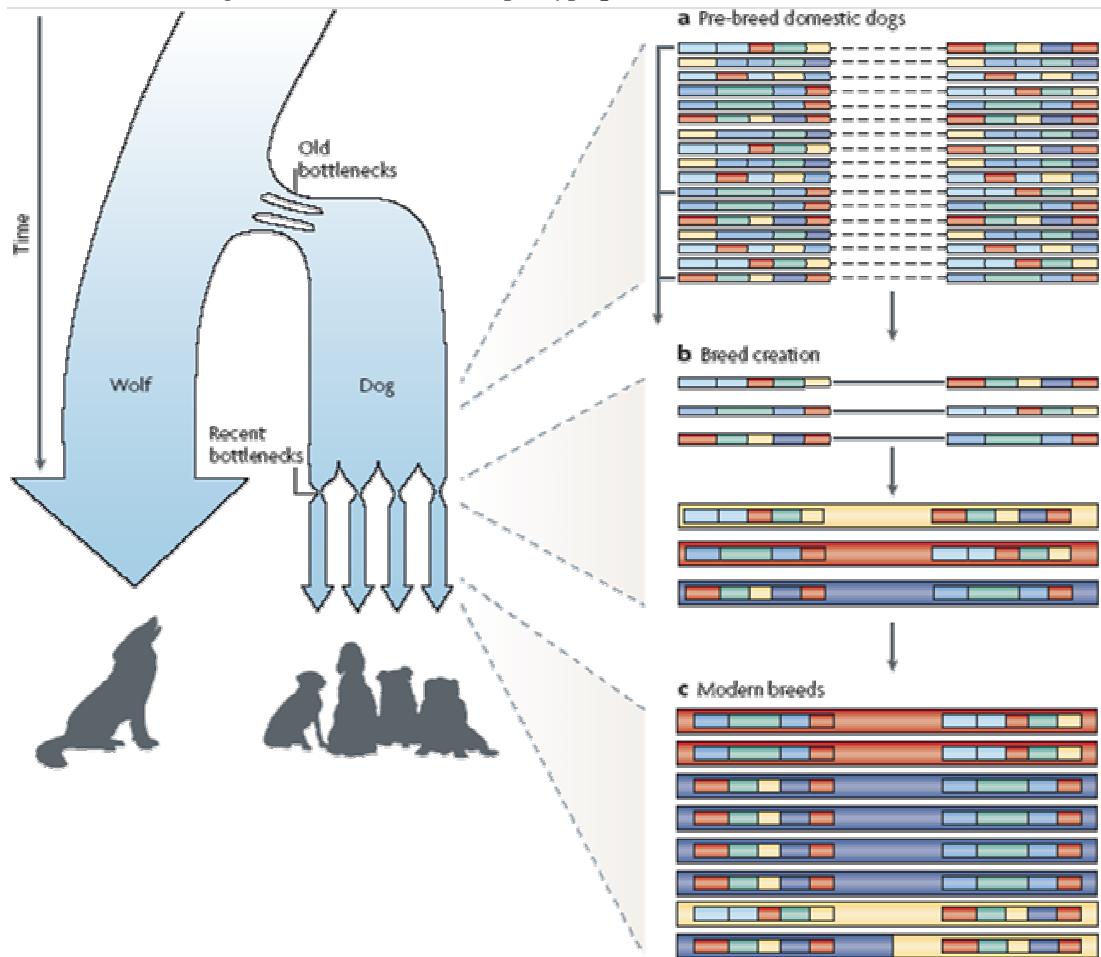
Afin de déterminer la région qui statistiquement a le plus de possibilités de contenir le gène recherché, différentes méthodes d'analyse des données de génotypage existent dont l'étude de liaison et l'étude d'association.

L'étude de liaison consiste à utiliser les liens de parentés qui existent entre les individus recrutés dans l'étude. Tous les individus sont ensuite génotypés pour les différents marqueurs. Les résultats sont alors analysés statistiquement avec, par exemple, la méthode des LOD-scores. Les LOD-scores permettent de cumuler l'information de plusieurs familles, dont l'information génétique est souvent incomplète. La méthode des LOD-scores consiste à tester statistiquement l'hypothèse de liaison génétique entre le locus recherché et le locus de chaque marqueur. Mais pour utiliser cette méthode, il est nécessaire de connaître le mode de transmission de la maladie et la pénétrance de la mutation. Il s'agit en effet d'une méthode dite paramétrique.

L'étude d'association consiste à comparer les fréquences des allèles d'un marqueur chez des sujets témoins et des sujets atteints. On ne travaille donc pas à partir des liens de parentés entre individus, mais on recrute une cohorte de patients et une cohorte de témoins. Cette méthode utilise le déséquilibre de liaison entre le marqueur et le locus du caractère étudié, qui se définit par l'existence d'une combinaison d'allèles à ces locus plus fréquente que celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance des locus. En effet, deux locus en déséquilibre de liaison sont en général très proches sur un même chromosome. C'est-à-dire au sein d'une population, les individus portant le caractère étudié présentent la même combinaison d'allèles (un haplotype) au niveau de la région contenant le gène recherché et cet haplotype est transmis en bloc au cours des générations. On parle alors d'un effet fondateur, en supposant qu'une mutation responsable du caractère observé s'est produite chez un ancêtre commun. Les résultats des génotypages effectués dans le cas d'une étude d'association sont analysés avec le test du  $\chi^2$ . (30)

Les études d'association sont très puissantes pour identifier des gènes canins, du fait de la structure particulière du génome du chien et de l'existence de nombreuses races constituant autant d'isolats génétiques. Le clonage positionnel chez le chien utilise donc fréquemment des études d'association. Une stratégie en deux étapes a été développée pour l'espèce canine, lorsque l'on s'intéresse à un caractère partagé par plusieurs races. (*Figure 28* et *Figure 29*) (28) (30) (32) (42)

*Figure 28 : Structure haplotypique du chien (28)*



*Dans l'évolution de l'espèce canine au cours du temps, il existe deux goulots d'étranglements (réduction marquée de la taille de la population suivie par la survie et l'expansion d'un petit échantillon aléatoire de la population d'origine), un ancien et un plus récent qui sont responsables de la structure haplotypique des races de chien d'aujourd'hui. Le premier correspond à la domestication du chien à partir du loup il y a environ 15000 ans. Le second est dû à la création des races dans les quelques derniers siècles. Les goulots d'étranglements ont créé la structure haplotypique et les déséquilibres de liaison (LD) particuliers des races actuelles.*

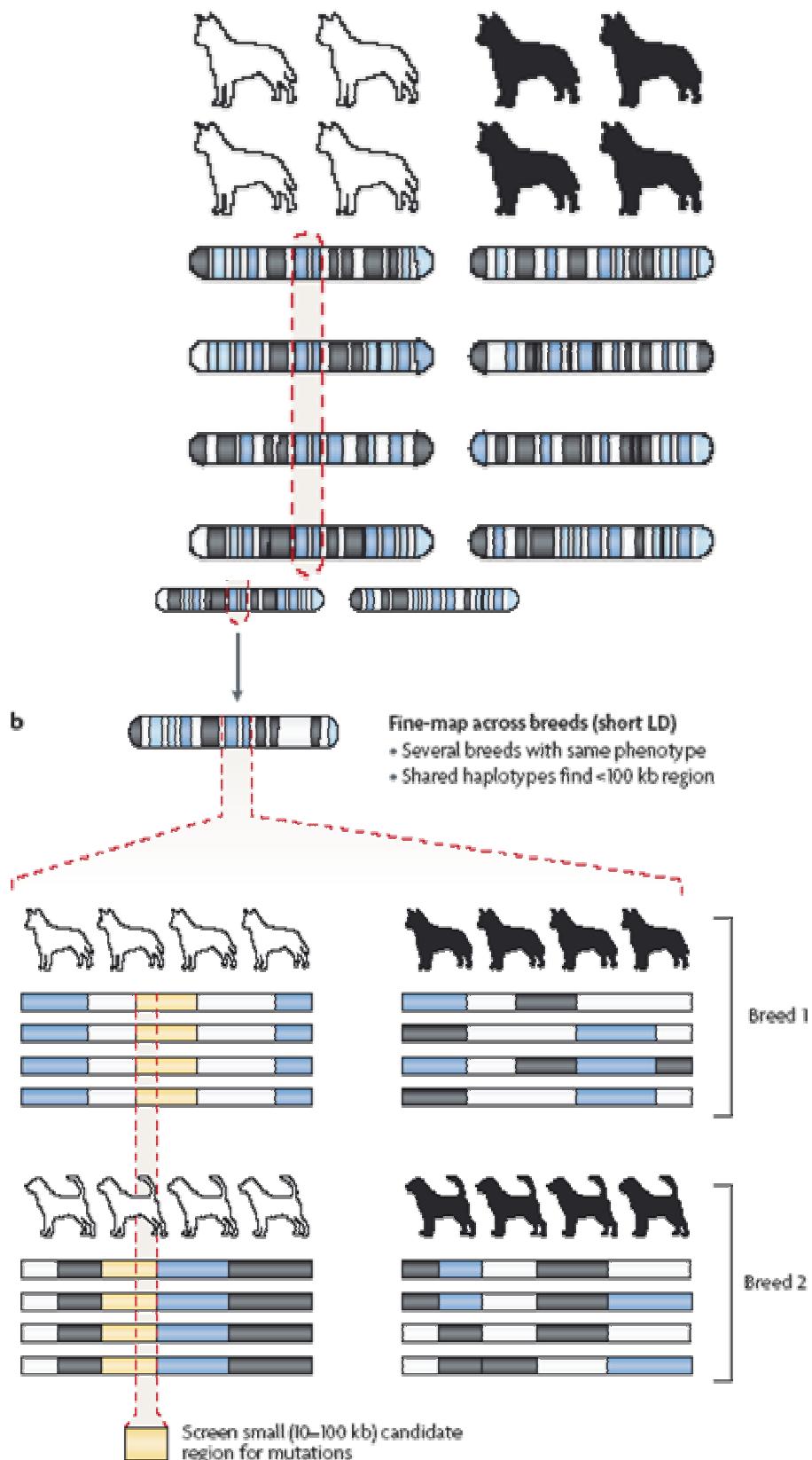
**a Pre-breed domestic dogs** / Avant la création des races actuelles, la population canine possédait un déséquilibre de liaison de courte distance (ce qui est attendu du fait de la grande taille de la population et de la longue période de temps entre les deux goulots d'étranglements).

**b Breed creation** / Au moment de la création des races, des petits sous-ensembles de chromosomes ont été sélectionnés dans la population des chiens domestiques (du fait de la

sélection d'un petit nombre d'individus fondateurs pour chaque race). Des blocs de grande taille portés par ces chromosomes sont devenus courants dans chaque race créant ainsi un déséquilibre de liaison grande taille (sur une longue distance chromosomique).

c Modern breeds / Depuis la création des races canines qui est récente, ces blocs de grande taille n'ont pas encore été fortement remodelés par les recombinaison. Cependant, ces blocs haplotypiques de grande taille conservent toujours les petits blocs haplotypiques de courte taille ancestraux de la population d'origine des chiens domestiques. On retrouve ces derniers lorsque l'on examine les chromosomes dans de nombreuses races.

Figure 29 : Stratégie de cartographie en deux étapes (28)



L'approche en deux étapes tire pleinement partie du déséquilibre de liaison (LD) étendu au sein de chaque race et du déséquilibre de liaison restreint lorsque l'on compare les races

*entre elles. Dans cet exemple, les chiens porteurs d'une mutation de la perte de la pigmentation (blanc) sont comparés avec les chiens normalement pigmentés (noir).*

**a** / *Dans la première étape, l'étude d'association à l'échelle de l'ensemble du génome, au sein d'une même race, utilise un nombre restreint d'individus et plusieurs milliers de marqueurs SNP pour identifier une ou plusieurs régions (en général de grande taille) qui sont associées au caractère étudié.*

**b** / *Dans la seconde étape, une cartographie fine est réalisée en utilisant beaucoup plus de SNP, dans plusieurs races qui partagent le même phénotype. Ceci permet de réduire la région candidate contenant la mutation à une courte région, du fait du court déséquilibre de liaison existant entre les races (en général une région de 10-100kb).*

La troisième étape consiste à recenser, dans l'intervalle candidat, les gènes présents et sélectionner ceux pouvant être responsables du phénotype étudié, en analysant l'expression et les rôles potentiels de chaque gène. Les gènes retenus sont ensuite séquencés chez quelques cas et quelques contrôles afin d'identifier la mutation. Il reste ensuite à valider la/les mutation(s) identifiée(s) du point de vue fonctionnel : impact sur la structure de la protéine codée, fonction de la protéine et implication dans le déterminisme du phénotype étudié. Cette étape de validation fonctionnelle est parfois très complexe.

Le clonage positionnel consiste donc à compléter la carte génétique de la région, en définissant la position du locus recherché sur le chromosome, puis à identifier les gènes de cette région pour mettre en évidence un gène candidat. Il s'agit d'une méthode longue et difficile. C'est pour cela qu'elle est souvent complétée par la méthode gène candidat décrite ci-dessous.

#### **IV.1.3.2. Gène candidat**

L'approche gène candidat consiste à poser l'hypothèse qu'un gène connu peut être responsable du phénotype étudié. Lorsqu'un caractère a été décrit de façon détaillée, il devient possible d'utiliser des banques de données pour identifier les gènes candidats. L'objectif est de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse. (18) (55)

Pour cela, il existe quatre façons de définir le gène candidat :

- gène candidat positionnel : le chromosome ou une région du chromosome responsable du phénotype a été identifié (par exemple par clonage positionnel). Dans ce cas, deux manières de rechercher le gène candidat sont possibles :
  - soit l'inventaire des gènes présents dans la région est réalisé à partir d'une base de données. Pour chaque gène de cette région, on regarde quels gènes peuvent convenir en fonction de leurs rôles et des informations connues sur le caractère étudié. Ainsi, une liste de gènes candidats est établie. Pour cela, il faut que l'espèce bénéficie d'une cartographie complète de ses gènes : tous les gènes de la région ainsi que leurs fonctions putatives doivent être connus. C'est globalement le cas des espèces dont le génome a été entièrement séquencé et annoté (la fonction putative des différents gènes a été indiquée) : homme, souris ou chien ; (18) (19) (55)

- soit pour les espèces où la cartographie est incomplète, on recherche la région homologue chez une autre espèce où la cartographie est plus complète et on en déduit les gènes homologues potentiellement présents dans la région. Grâce aux cartes comparatives entre espèces, on peut connaître les régions homologues conservées dans plusieurs espèces. (7) De la même façon que ci-dessus, on en déduit la liste des gènes candidats ; (18) (55)
- gène candidat indépendant de la position : la position du locus responsable du phénotype étudié n'est pas connue. Dans ce cas, deux manières de rechercher les gènes candidats sont possibles :
  - soit un phénotype similaire à celui étudié chez le chien a été décrit dans une autre espèce (homme, souris) pour laquelle le gène responsable est connu. On recherche alors le gène homologue chez le chien. S'il existe, il s'agit alors d'un gène candidat pour le phénotype canin ; (18) (55)
  - soit l'étude physiopathologique, cellulaire ou moléculaire du caractère analysé suggère que le gène responsable appartient à une famille de gènes connus, on en déduit alors les gènes candidats possibles pour ce caractère. (18) (55)

Ensuite, le gène candidat est séquencé chez quelques individus présentant le caractère et quelques individus témoins ne le présentant pas. En comparant les séquences pour ces deux groupes, une mutation causale peut parfois être identifiée.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les deux techniques de clonage positionnel et d'approche gène candidat sont complémentaires. Le clonage positionnel appartient à la génétique dite « inverse » : le gène impliqué dans le caractère héréditaire est identifié directement, sans que la protéine défective soit connue. En effet, en détaillant la méthodologie du clonage positionnel suivie de l'approche gène candidat, on se rend compte qu'aucune étape ne concerne l'anomalie de la protéine codée par le gène défectueux. Seule l'anomalie génétique est étudiée, et seule la liaison (ou l'association) entre le gène incriminé et le caractère étudié est démontrée. C'est seulement lorsque la séquence nucléotidique du gène est connue que l'on peut déduire la séquence d'acides aminés qui compose la protéine correspondante. À partir de cette séquence, on peut aboutir à la structure de la protéine normale et de la protéine mutée et comprendre la physiopathologie de la maladie. (18) (55)

Dans le cas des yeux bleus chez le beagle, la recherche des gènes candidats s'est faite en déterminant les gènes responsables de la couleur des yeux bleus chez l'homme, car chez le chien aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur le déterminisme de la couleur des yeux non liée à la couleur du pelage. De plus, chez l'homme, plusieurs gènes responsables de la couleur des yeux bleus ont été identifiés. Ils sont décrits ci-après. Nous avons donc postulé que le phénotype de l'homme et du beagle étaient comparables et nous avons analysé si les gènes canins homologues des gènes humains pouvaient être responsables de la couleur des yeux bleus chez le beagle.

## **IV.2. Gènes responsables de la pigmentation de l'œil chez l'homme**

Chez l'homme, la couleur des yeux a une haute héritabilité de 98%, ce qui a permis de conclure que la couleur des yeux est déterminée génétiquement (36). La transmission génétique de la couleur des yeux n'est pas strictement mendélienne bien que la couleur bleue de l'iris suive en grande partie un modèle récessif. Ainsi, plusieurs gènes seraient responsables de la transmission de la couleur des yeux : c'est un caractère polygénique. Cependant Zhu *et al.* (16) ont estimé qu'un ou plusieurs locus dans la région qui contient le gène *OCA2* du chromosome 15 expliqueraient 74% de la variance du caractère « couleur des yeux ». Ceci confirmait qu'il existe une base génétique à la variation de la couleur des yeux chez l'homme. Les gènes *OCA2* (*oculocutaneous albinism type 2*) /*HERC2* (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*) expliqueraient la transmission de la couleur bleue et brune des yeux tandis que d'autres gènes tels que *SLC2A4* (*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4*), *TYR* (*tyrosinase*), *TYRP1* (*tyrosinase related protein 1*), *SCL45A2* (*solute carrier family 45, member 2*) et *IRF4* (*interferon regulatory factor 4*) contribueraient à la nuance de la couleur des yeux. Ces derniers gènes auraient donc des effets mineurs par rapport à *OCA2/HERC2*. (33)

### ***IV.2.1. Gène OCA2 (oculocutaneous albinism type 2)***

Des mutations dans le gène *OCA2* ont été identifiées comme responsables de l'albinisme oculo-cutané de type 2. Le gène contient 24 exons et a une longueur d'environ 3186 pb. Il code une protéine transmembranaire avec 12 domaines ressemblant à des canaux ioniques. La protéine se situe dans les mélanosomes. La fonction de la protéine n'est pas connue mais elle pourrait être impliquée dans la fabrication et la circulation de la tyrosinase, dans la régulation du pH du mélanosome ou dans la régulation du métabolisme du glutathion. Le gène *OCA2* aurait ainsi un rôle dans la régulation de la mélanogénèse, comme le montre l'hypopigmentation de la peau, des cheveux et des yeux qui survient à la suite d'une délétion de la région englobant le gène *OCA2* situé sur le chromosome 15 humain (syndromes de Prader-Willi et d'Angelman). Inversement, des insertions de copies de la région englobant le gène *OCA2* entraînent une hyperpigmentation de la peau. De plus le gène *OCA2* humain possède un homologue chez la souris qui est responsable du phénotype yeux rouges dilué dans cette espèce. (15) (16) (51) (52)

Donnelly *et al.* (15) ont réalisé une étude d'association entre les différents SNP dans la région du gène *OCA2* chez des individus de différentes populations. Trois SNP dans l'intron 1 du gène *OCA2* étaient associés aux phénotypes de la couleur des yeux. Les trois SNP étaient rs4779138, rs4778241, rs7495174 et l'haplotype associé aux yeux bleus était A-C-A.

Un autre SNP (rs1800407) a été identifié dans l'exon 13 et était associé à la couleur verte des yeux. De plus, il augmentait la pénétrance du phénotype yeux bleus chez les individus A-C-A lorsque l'allèle T de ce SNP était présent. (15)

D'autres associations plus fortes ont été trouvées à proximité du gène *OCA2*, dans le gène *HERC2*. (15)

#### **IV.2.2. Gène HERC2 (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*)**

Le gène *HERC2* est situé en amont du gène *OCA2*. La fonction du gène *HERC2* est inconnue mais la protéine codée montre des similitudes avec une protéine ligase ubiquine E3. De plus, il a été montré que des régions non codantes de *HERC2* contrôlent l'expression du gène *OCA2*. L'intron 86 de *HERC2* contient une région régulatrice de l'expression du gène *OCA2* et c'est une région hautement conservée entre différentes espèces.(52)

Donnelly *et al.* (15) ont réalisé une étude d'association entre différents SNP situés dans une région du gène *HERC2* chez des individus de différentes populations. Quatre SNP ont été associés à la couleur des yeux. Le SNP rs12913832 est situé dans l'intron 86, il est dans une région fortement conservée et il est fortement associé à la couleur des yeux. Le SNP rs1129038 est situé dans la région 3'UTR (*UnTranslated Region*) de l'exon 93 qui a une séquence moins conservée entre différentes espèces. De même, il est fortement associé à la couleur des yeux et il est proche du SNP rs129113832. Les yeux bleus sont associés à l'allèle T de rs1129038 et à l'allèle G de rs12913832 ce qui forme l'haplotype T-G. Le SNP rs916977 est situé dans l'intron 12. Le SNP rs1667394 est localisé dans l'intron 4. Ces deux SNP sont associés à la couleur des yeux et l'haplotype associé à la couleur yeux bleus est C-A. Mais ces marqueurs ne sont pas universels et parfois absents dans certaines populations.

Ainsi, les marqueurs SNP rs1129038 et rs12913832 étaient les meilleurs marqueurs pour les yeux bleus. Ils sont certainement proches de l'allèle responsable de la couleur des yeux bleus (en déséquilibre de liaison) à moins que ces deux SNP ne soient causaux. (15) (36) (52)

#### **IV.2.3. Autres gènes**

D'autres gènes chez l'homme, dont *SLC2A4*, *TYR*, *TYRP1* (*tyrosinase related protein 1*), *SCL45A2* (*solute carrier family 45, member 2*) et *IRF4* (*interferon regulatory factor 4*) ont été identifiés comme responsables de la grande diversité de la couleur des yeux et jouent un rôle dans les nuances de la couleur. Ils auraient donc des effets mineurs sur la couleur des yeux.

Le gène *IRF4* aurait une plus faible association avec la couleur des yeux par rapport aux autres gènes.

En revanche, le SNP rs16891982 du gène *SLC45A2* était fortement associé avec les yeux clairs versus yeux foncés. Mais cette association était plus faible qu'avec le locus *OCA2/HERC2*. (36) (51)

#### **IV.2.4. Détection de trois nouveaux locus par la recherche de QTL**

##### ***IV.2.4.1. Notion de QTL (24)***

Un QTL (*quantitative trait locus*) se définit comme un locus dont au moins deux formes alléliques sont associées à des valeurs phénotypiques moyennes différentes pour le caractère étudié. Ainsi lors d'une étude d'association entre le phénotype d'une population et sa composition génétique, il peut exister un ou plusieurs phénotypes associés à des différences de génotype dans certaines régions du génome.

Un caractère quantitatif présente une variation continue du phénotype et peut être sous le contrôle d'un ou plusieurs QTL.

#### **IV.2.4.2. Trois nouveaux locus (33)**

Dans l'étude de Liu *et al.* (33), la couleur des yeux a été quantifiée de façon linéaire, permettant ainsi d'améliorer le pouvoir d'identification d'associations génétiques avec la couleur des yeux. Ainsi, trois nouveaux locus ont été identifiés.

Sur le chromosome 1 (1q42.3), deux SNP (rs3768056, rs9782955) étaient associés à la couleur des yeux. Ils se situaient dans des introns du gène *LYST* (*lysosomal trafficking regulator*) qui régule la migration des mélanosomes. Le gène *LYST* peut influencer l'intensité de la couleur des robes chez la vache. Il est susceptible d'introduire de subtiles variations dans la pigmentation.

Sur le chromosome 17 (17q25.3), trois SNP étaient associés à la couleur des yeux. Deux SNP (rs7219915, rs9894419) se situaient dans un intron et un exon du gène *NPLOC4* (*nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)*) et l'autre SNP (rs12452184) était localisé dans un intron du gène *HGS* (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*). Dans la région, il existait de plus de nombreux petits gènes. Le meilleur candidat avec l'association observée était le gène *PDE6G* (*phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma*) qui est responsable d'un disfonctionnement de l'épithélium pigmentaire de la rétine lorsqu'il est muté.

Sur le chromosome 21 (21q22.3), cinq SNP ont été identifiés comme étant associés à la couleur des yeux. Quatre SNP (rs1003719, rs2252893, rs2835621, rs2835630) étaient situés dans l'intron du gène *TTC3* (*tetratricopeptide repeat domain 3*) et l'autre SNP (rs7277820) était localisé dans le 5'UTR du gène *DSCR9* (*Down syndrome critical region gene 9*). Ces deux gènes appartiennent au même block en déséquilibre de liaison. Le gène *DSCR9* est par ailleurs un gène spécifique de la lignée des primates.

De plus, dans cette étude, le locus *OCA2/HERC2* était aussi très fortement associé à la couleur des yeux en particulier le SNP rs12913832 localisé dans l'intron 86 de *HERC2*.

Ainsi, chez l'homme plusieurs gènes et régions chromosomiques ont été identifiés comme impliqués dans le déterminisme de la couleur des yeux.

## **DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**



## I. Animaux

Vingt chiens de race beagle ont été utilisés pour cette étude (*Tableau 2*) (dont 13 chiens présentant des hétérochromies de l'iris (10 males et 3 femelles). Parmi ces chiens :

- les beagles aux yeux marron provenaient d'élevage de beagles de l'ENVA ;
- les beagles H9L2210 (Dumbo), HOB2628 (Saphir), HOG3700 (Balou), HOB2357 (Turquoise), H2F1068, H2E0725 et H2F1072 provenaient de l'élevage Harlan (élevage français produisant des beagles pour l'expérimentation) ;
- le beagle 7304871 (Falcon) provenait de l'élevage Marshall en Italie ;
- les beagles 1927312 NYAA (Atchoum) et 1907192 NYAA (Barbie) provenaient de l'élevage Marshall aux Etats-Unis ;
- les autres beagles ayant une hétérochromie de l'iris étaient nés dans l'élevage de l'ENVA.

*Tableau 2 : Liste des chiens inclus dans l'étude*

Nom	Tatouage	Date Naissance	Sexe	Elevage	Examens
<b>DUMBO</b>	H9L2210	28/11/2009	Mâle	Harlan	-Examen ophtalmologique -ERG -Génotypage
<b>SAPHIR (BEAUGOSSE)</b>	H0B2628	09/02/2010	Mâle	Harlan	-Examen ophtalmologique -ERG - Génotypage
<b>BALOU</b>	H0G3700	03/07/2010	Mâle	Harlan	-Examen ophtalmologique -ERG - Génotypage
<b>FALCON</b>	730 48 71	01/06/2011	Mâle	Marshall Italie	-Examen ophtalmologique -ERG - Génotypage
<b>TURQUOISE</b>	H0B2357	02/02/2010	Femelle	Harlan	-Examen ophtalmologique -ERG - Génotypage

<b>ATCHOUM</b>	1927312 NYAA	17/12/2011	Mâle	Marshall USA	-Examen ophtalmologique -ERG - Génotypage
<b>BARBIE</b>	1907192 NYAA	17/11/2011	Femelle	Marshall USA	-Examen ophtalmologique - Génotypage
<b>NEO</b>		25/04/2012	Mâle	ENVA	-Examen ophtalmologique - Génotypage
<b>Chiot de turquoise (mâle 2)</b>		25/04/2012	Mâle	ENVA	- Génotypage
<b>Chiot de turquoise (mâle 4)</b>		25/04/2012	Mâle	ENVA	- Génotypage
<b>WIKI</b>	H2E0725	06/05/2012	Femelle	Harlan	-Examen ophtalmologique - Génotypage
<b>KAWAI</b>	H2F1068	03/06/2012	Mâle	Harlan	-Examen ophtalmologique - Génotypage
<b>KIWI</b>	H2F1072	03/06/2012	Mâle	Harlan	-Examen ophtalmologique - Génotypage
<b>ZAZA</b>			Femelle	ENVA	Aucun
<b>SAKURA</b>	2GLS381	18/01/2010	Femelle	ENVA	- Génotypage
<b>BRIOCHE</b>	HOE3067	12/05/2010	Femelle	ENVA	- Génotypage
<b>LOUTRE</b>			Femelle	ENVA	- Génotypage
<b>KIMI</b>	2FJD052	23/11/2006	Femelle	ENVA	- Génotypage

<b>BROWNIE</b>			Femelle	ENVA	Aucun
<b>PRUNILLE</b>	H0B2467	17/02/2010	Femelle	ENVA	- Génotypage

## **II. Matériel et méthode**

### **II.1. Ophthalmologie**

#### **II.1.1. Examen ophtalmologique**

Pour l'examen ophtalmologique, les chiens étaient placés dans une salle en semi-obscurité.

L'examen ophtalmologique consistait tout d'abord à évaluer la fonction visuelle avec le test du clignement à la menace et avec l'évaluation des réflexes photomoteurs direct et indirect. Le réflexe du clignement à la menace était réalisé en approchant rapidement la main vers l'œil du chien sans le toucher, le réflexe était positif lorsque l'animal fermait les paupières. Les réflexes photomoteurs étaient réalisés à l'aide d'un transilluminateur de Finoff (laboratoire Heine, Allemagne). Le faisceau lumineux était placé en direction de la pupille de l'œil du chien ; le réflexe direct était positif lorsque la pupille éclairée se mettait en myosis et le réflexe indirect était positif lorsque la pupille controlatérale se mettait en myosis.

À l'aide du transilluminateur de Finoff, la transparence et la position du cristallin étaient évaluées par la mise en évidence des images de Purkinje-Sanson qui permettent de visualiser des reflets de la lumière lorsque l'œil est éclairé. Elles étaient au nombre de trois : lorsque le transilluminateur était tourné dans le sens horaire, les deux premières images tournaient dans le sens horaire et la troisième image tournait dans le sens antihoraire. Cet examen permet de vérifier la bonne transparence et la bonne position du cristallin.

Ensuite, un test de Schirmer était réalisé à l'aide de bandelettes Schirmer-Plus<sup>®</sup> (laboratoire Dina-hitex, République Tchèque) placées dans le cul de sac conjonctival inférieur pendant une minute ; la valeur normale chez un chien est de 15 +/- 4 mm par minute.

Ultérieurement, la pression intraoculaire était mesurée grâce à la tonométrie électronique par rebond ; l'appareil utilisé était le TonoVet<sup>®</sup> (laboratoire Toilat, Finlande) ; la valeur usuelle chez le chien est entre 10 et 20 mm de mercure.

Enfin, pour la réalisation de l'examen du fond d'œil, les chiens ont reçu préalablement un collyre mydriatique (Mydriaticum<sup>®</sup> 0,5%, laboratoire Théa, France), cet examen était effectué avec un ophthalmoscope indirect (HEINE EN20-1, Allemagne) et une lentille de +30 dioptries (HEINE, Allemagne). Les photographies des fonds d'œil étaient réalisées à l'aide de l'appareil GENESIS<sup>®</sup> (groupe Kowa company ltd, Japon).

#### **II.1.2. Examen ERG**

##### **II.1.2.1. Anesthésie et préparation des animaux**

Les chiens étaient préparés en ambiance mésopique. Les pupilles étaient dilatées grâce à l'instillation de tropicamide (Mydriaticum@0,5%, laboratoire Théa, France). Les animaux étaient ensuite anesthésiés. L'induction était réalisée avec du propofol (Propovet®, laboratoire Abbott, Royaume-Uni) puis l'anesthésie était maintenue par voie gazeuse avec un mélange isoflurane/ O2.

Les paupières étaient ouvertes avec un blépharostat et des fils de traction étaient placés au limbe de façon à maintenir une exposition satisfaisante du globe. Avant l'application des électrodes, un substitut de larmes (Viskyal®, laboratoire TVM, France) était instillé. Lors de

la manipulation des beagles, les animaux étaient placés sur un tapis chauffant de manière à maintenir une température corporelle proche de 38°-39°. Un drap opaque recouvrait l'animal afin d'éviter au maximum toutes sources de lumière parasite. L'ensemble des manipulations était réalisé au même moment de la journée (le matin) de manière à éviter toute variation liée au rythme circadien.

#### ***II.1.2.2. Matériel et réglage du matériel***

L'appareil utilisé était de type Réti-Port (laboratoire Roland Consult, Allemagne). Le flash lumineux achromatique était délivré au niveau de l'électrode active. L'électrode active était une coque placée au niveau de la cornée. L'électrode de référence était placée sous la peau à proximité du canthus latéral de l'œil stimulé. L'électrode de masse était placée sous la peau du dos.

Avant de commencer les enregistrements, l'impédance des électrodes était contrôlée pour chaque œil et devait être inférieure à  $5\text{ k}\Omega$ .

#### ***II.1.2.3. Protocole***

Le protocole était issu de celui préconisé par Narfström *et al.* (37). Celui-ci permet d'obtenir des résultats fiables et reproductibles dans l'espèce canine.

##### Etude de l'adaptation à l'obscurité (système scotopique) :

L'adaptation à la lumière était réalisée pendant 20 minutes. Le chien était placé sous un tissu occultant. Un flash lumineux achromatique d'intensité de  $0,03\text{ cd/m}^2/\text{s}$  était délivré toutes les 4 minutes (1, 4, 8, 12, 16 et 20 minutes).

##### Réponse mixte cône/bâtonnet :

Quatre flashes de  $3\text{cd/m}^2/\text{s}$  étaient délivrés en fin d'adaptation à l'obscurité toutes les 10 secondes. Une moyenne de réponses obtenues pour cette stimulation a été déterminée. À partir de la réponse mixte cône/bâtonnet, les potentiels oscillatoires scotopiques ont été extraits après modification de la bande passante du Rétiport.

##### Evaluation du système photopique :

Le chien était placé en ambiance photopique ( $30\text{-}40\text{cd/m}^2$ ) pendant 10 minutes. Le fonctionnement des cônes était testé avec 4 flashes d'intensité de  $3\text{ cd/m}^2/\text{s}$  et la moyenne des réponses était établie. La fréquence de stimulation était de 5Hz.

##### Flicker :

Trente flashes d'intensité de  $3\text{ cd/m}^2/\text{s}$  étaient délivrés à une fréquence de 31 Hz.

#### ***II.1.2.4. Analyse statistique des résultats***

L'analyse des résultats a été réalisée avec le test statistique U de Mann Whitney (test non paramétrique pour la comparaison de deux groupes dont les distributions ne sont pas normales). Les résultats des tests étaient obtenus grâce au logiciel STATVIEW version 5.0 (SAS Institute).

## **II.2. Génétique**

### **II.2.1. Arbres généalogiques**

Pour les beagles inclus dans l'étude et provenant de l'élevage Harlan, un arbre généalogique a été réalisé, à l'aide du logiciel Pedigree Draw 6.0 (<http://www.pedigree-draw.com/descPD60.html>, Macintosh OS X). Les pedigrees ont été fournis par l'élevage Harlan. L'arbre généalogique a été complété avec les croisements faits à l'ENVA entre des beagles de l'élevage Harlan et de l'ENVA.

### **II.2.2. Extraction d'ADN**

#### ***II.2.2.1. À partir du sang***

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de prélèvements de sang sur des tubes EDTA (acide éthylène diamine tétracétique).

Le sang a été transvasé dans un tube à centrifuger de 50 mL. Un volume quadruple de solution de lyse des globules rouges (SLR) y a été ajouté.

La préparation d'un litre de SLR consiste à ajouter les composants suivants :

- TRIS 1 molaire (M) dilué au 1/100 : 10mL ;
- MgCl<sub>2</sub> 1M dilué au 1/200 : 5mL ;
- NaCl 1M dilué au 1/500 : 2mL ;
- H<sub>2</sub>O : 983mL.

Les tubes ont été agités sur rouleaux pendant 5 minutes puis centrifugés 10 minutes à 1500 tours/min à 4°C. À partir du culot de globules rouges obtenu, l'utilisation d'un automate MAXWELL 16 (Promega, USA) a permis l'extraction d'ADN (*Annexe 1, Annexe 3*). Les quantités d'ADN ont alors été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre NANODROP 2000 (Cabtech, France).

#### ***II.2.2.2. À partir de brossettes***

Une brossette par chien a été frottée contre la muqueuse buccale. L'extraction de l'ADN a été réalisée suivant le protocole décrit dans la notice (*Annexe 2, Annexe 3*) et avec l'utilisation d'un automate du MAXWELL 16 (Promega, USA).

## II.2.3. PCR

### II.2.3.1. Dessin des amorces de PCR

Les amorces utilisées pour la PCR ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>).

Pour le séquençage d'une partie de l'intron 85 du gène *HERC2* canin, (cette partie correspond à la position du SNP rs12913832 humain), les amorces choisies étaient assez grandes car des amorces plus petites n'étaient pas assez sélectives. Cette région très conservée entre le chien et l'homme mesurait 398 nucléotides. (*Tableau 3*)

*Tableau 3 : Amorces choisies pour le séquençage d'une partie de l'intron 85 du gène HERC2*

	Amorce « forward »	Amorce « reverse »
Int85long	ttgtccatgagggcagttcccattc	acatgcctgcctagtcacatacagg

### II.2.3.2. Réaction de PCR

La réaction de PCR permet l'amplification des fragments d'ADN. Le protocole utilisé était pour une réaction :

- eau stérile : 18,8 µL ;
- amorces à 10µM : 0,5+0,5 µL ;
- nucléotides libres (dNTP 10mM) : 0,5 µL ;
- tampon avec MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM concentré 10 fois : 2,5 µL ;
- taq polymérase (QBiogen S.A. France, Courtaboeuf, France) : 0,2 µL ;
- ADN à 20 ng/µL : 2 µL ;
- volume total : 25 µL.

Le programme de PCR utilisé fut le suivant :

- dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C ;
- 30 cycles composés de 3 phases : 20 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C ;
- élongation finale de 5 minutes à 72°C.

La qualité des amplifications a été vérifiée par une électrophorèse dans un gel d'agarose à 3 % coloré au GelRed (Biotium, Hayward, Californie).

Pour le pyroséquençage, le programme de PCR était le suivant.

Le protocole utilisé était pour une réaction :

- eau stérile : 36,5 µL ;
- amorces à 10µM : 1+1 µL ;
- nucléotides libres (dNTP 10mM) : 1 µL ;
- tampon avec MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM concentré 10 fois : 5 µL ;
- taq polymérase (QBiogen S.A. France, Courtaboeuf, France) : 0,5 µL ;
- ADN à 20 ng/µL : 5 µL ;
- volume total : 50 µL.

Le programme de PCR utilisé fut le suivant :

- dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C ;
- 50 cycles composés de 3 phases : 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C ;
- élongation finale de 5 minutes à 72°C.

#### **II.2.4. Séquençage**

Les séquences d'ADN ont été obtenues après envoi de 10µL de produit de PCR et des amorces de PCR chez GATC (GATC Biotech, Contance, Allemagne, [www.gatc-biotech.com](http://www.gatc-biotech.com)). Elles ont été réalisées à partir de l'ADN de Brioche, Sakura, Turquoise et Beaugosse.

#### **II.2.5. Pyroséquençage**

Pour tous les chiens, dont l'ADN a été recueilli, l'ADN a été séquencé par pyroséquençage.

Le pyroséquençage avait pour but de déterminer si la variation trouvée dans la séquence de l'intron 85 de *HERC2* se retrouvait chez des chiens aux yeux marron et aux yeux bleus. Le pyroséquenceur permet de séquencer une très petite séquence (quelques dizaines de nucléotides) à la suite de l'amorce de séquence.

Tout d'abord, un appareil de recueils des monobrins d'ADN a été utilisé (Biotage, Uppsala, Suède : [www.biotage.com](http://www.biotage.com)). Des microbilles recouvertes de streptavidine (40µl) 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 :

- éthanol à 70°,
- solution de dénaturation (Biotage),
- solution de lavage (Biotage).

Les billes ont été déposées dans la plaque de 96 puits de pyroséquençage (Biotage) qui contenait le primer de séquençage à 1,6 µM en solution dans 40 µl 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) et a été assortie d'une cartouche contenant :

- l'enzyme (polymérase, Biotage),
- le milieu réactionnel (Biotage),
- les quatre bases A, T, G, C (Biotage).

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

## **II.2.6. Logiciels utilisés**

Les recherches de séquences de gènes dans les génomes canins et humains ont été effectuées à l'aide de la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org>). (19)

La recherche de séquences conservées entre l'homme et le chien a été effectuée grâce à l'utilitaire BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). (40)

Les alignements de séquences nucléotidiques ont été effectués à l'aide du logiciel Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). (13)

Les amorces de PCR et de séquençage ont été dessinées à l'aide du logiciel PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>).

Les amorces utilisées pour le pyroséquençage ont été dessinées à l'aide du logiciel PSQ Assay Design (Biotope, Suède).

L'analyse des résultats de séquençage a été réalisée à l'aide du logiciel Chromaslite 2.01 (Technelysium Pty Ltd : [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)).

Les conversions de format de séquence ont été effectuées à l'aide du logiciel BCM Search Launcher : Sequence Utilities (<http://searchlauncher.brm.edu/seq-util/seq-util.html>).

L'arbre généalogique a été réalisé, à l'aide du logiciel Pedigree Draw 6.0 (<http://www.pedigree-draw.com>).

### **III. Résultats**

#### **III.1. Etude ophtalmologique**

##### **III.1.1. Examen ophtalmologique**

Le beagle HOB2628 présentait, aux deux yeux, une hétérochromie de l'iris se traduisant par une différence de coloration sur chaque iris (présence de plages bleues et marron). Son œil droit (10 % de plage marron) était plus dépigmenté que son œil gauche (50 % de plage marron) (*Figure 30*). De même le beagle H2F1072 présentait aux deux yeux une hétérochromie de l'iris ; son iris droit avait environ 50% de plage marron et 50 % de plage bleue et son iris gauche était plus pimenté sur environ 90 % de la surface.

*Figure 30 : Couleur des iris du beagle HOB2628*



*Œil droit*



*Œil gauche*

Les beagles HOG3700, H9L2210, HOB2357, H2F1068 et 7304871 possédaient un iris gauche pigmenté de couleur marron et un iris droit de couleur bleue (*Figure 31*).

Les beagles 1907192NYAA et H2E0725 avaient un iris de couleur bleue à gauche et un iris pigmenté de couleur marron à droite.

Les beagles 1927312NYAA et NEO avaient les deux iris de couleur bleue.

Figure 31 : Couleur des iris du beagle HOG3700



Œil droit

Œil gauche

Les anomalies du cristallin et de la cornée étaient absentes, la réponse à la menace, le réflexe photomoteur, l'examen oculaire, le test de Schirmer et la pression intraoculaire étaient normaux chez ces beagles (*Tableau 4 et Tableau 5*).

*Tableau 4 : Résultats de la réponse du test du clignement à la menace et des réflexes photomoteurs*

Beagle	Clignement à la menace		Réflexe photomoteur direct		Réflexe photomoteur indirect	
	Œil droit	Œil gauche	Œil droit	Œil gauche	Œil droit	Œil gauche
HOB2628	+	+	+	+	+	+
HOG3700	+	+	+	+	+	+
H9L2210	+	+	+	+	+	+
HOB2357	+	+	+	+	+	+
H2F1072	+	+	+	+	+	+
H2E0725	+	+	+	+	+	+
H2F1068	+	+	+	+	+	+
NEO	+	+	+	+	+	+
7304871	+	+	+	+	+	+
1907192 NYAA	+	+	+	+	+	+
1927312 NYAA	+	+	+	+	+	+

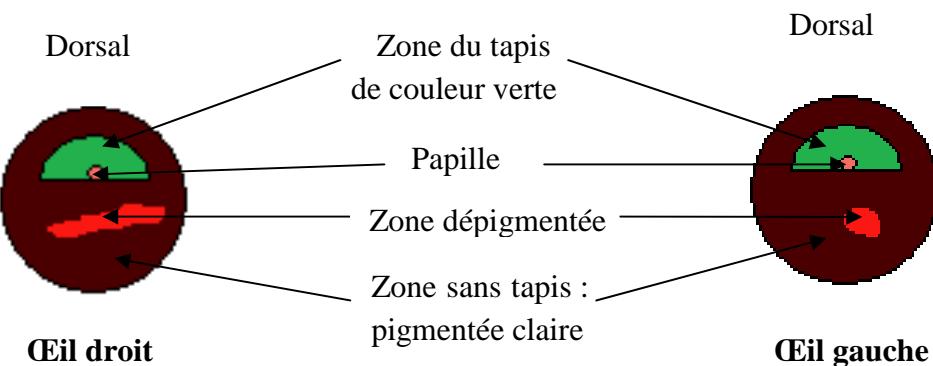
+ : indique une réponse présente

Tableau 5 : Résultats du test de Schirmer et de la pression intraoculaire

Beagle	Test de Schirmer (en mm/min)		Pression intraoculaire (mmHg)	
	Œil droit	Œil gauche	Œil droit	Œil gauche
HOB 2628	20	22	17	20
HOG 3700	27	24	17	17
H9L 2210	19	15	19	21
HOB 2357	25	18	17	19
H2F 1072	12	13	Non réalisé	Non réalisé
H2E 0725	15	15	16	17
H2F 1068	18	15	20	23
NEO	20	10	21	21
7304871	22	23	19	17
1907192 NYAA	Non réalisé	Non réalisé	14	18
1927312 NYAA	Non réalisé	Non réalisé	20	25

Le fond d’œil du beagle HOB 2628 présentait une zone en position dorsale avec un tapis de couleur verte et une zone sans tapis de couleur marron clair incluant une zone dépigmentée de couleur rouge laissant apparaître la vascularisation de la choroïde. La zone dépigmentée était de taille plus importante à droite qu’à gauche. Les fonds d’œil à droite et à gauche étaient similaires (*Figure 31*).

Figure 31 : Schéma et photos du fond d'œil du beagle HOB2628



Fond d'œil à droite de HOB2628

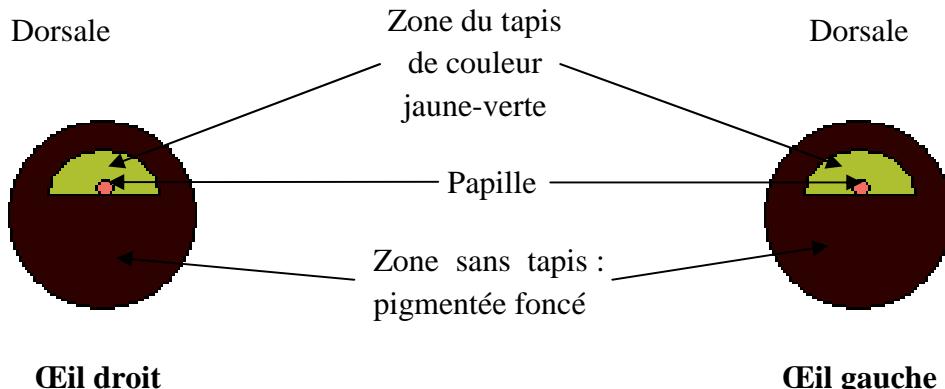


Fond d'œil à gauche de HOB2628

Photos : Unité d'ophtalmologie, CHUVA, ENVA.

Le beagle H2F1072 présentait un fond d'œil identique à droite et à gauche. La zone du tapis en position dorsale était de couleur jaune-vert. La zone sans tapis était pigmentée de couleur marron foncé. (Figure 32)

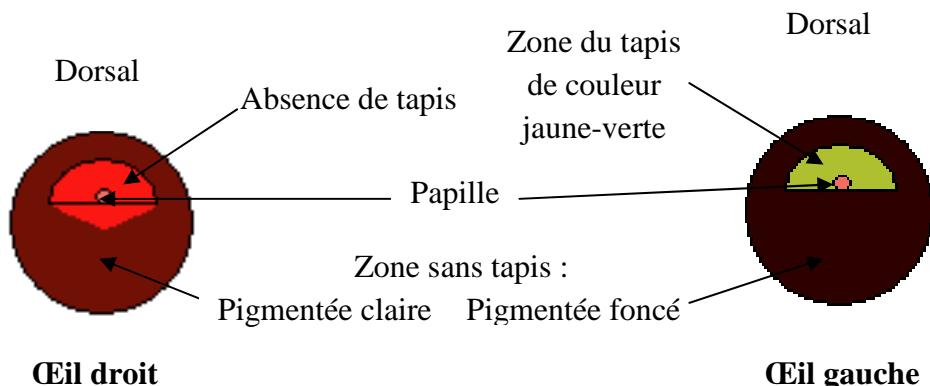
Figure 32 : Schéma du fond d'œil du beagle H2F1072



Les fonds d'œil à gauche des beagles HOG3700, H9L2210, HOB2357, H2F1068 et 7304871 possédaient une zone du tapis de couleur jaune-vert et une zone sans tapis pigmentée de couleur marron foncé. Les fonds d'œil à droite des beagles HOG3700, H9L2210,

HOB2357, H2F1068 et 7304871 présentaient une zone dépigmentée en position dorsale avec absence de tapis, de couleur rouge, laissant apparaître les vaisseaux de la choroïde et une zone sans tapis pigmentée qui était plus claire que la zone sans tapis de l'œil controlatéral. (*Figure 33, Figure 34, Figure 35*)

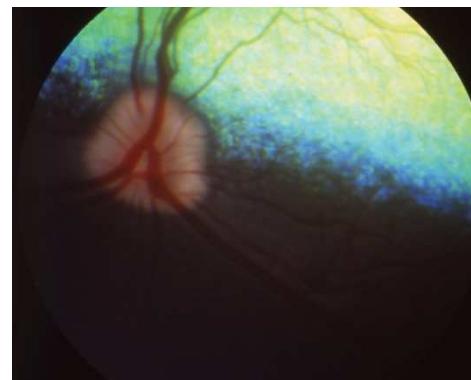
*Figure 33: Schémas des fonds d'œil des beagles HOG3700, H9L2210, HOB2357, H2F1068 et 7304871*



*Figure 34 : Fonds d'œil du beagle H9L2210*

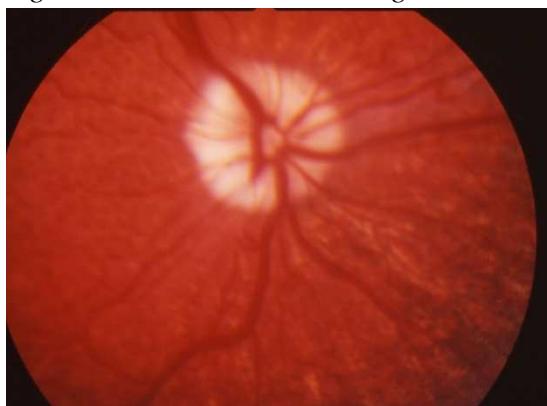


*Fond d'œil à droite*

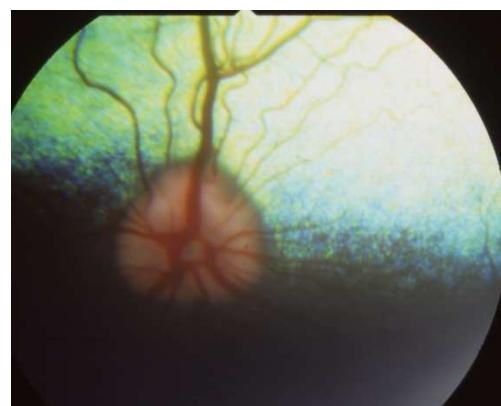


*Fond d'œil à gauche*

*Figure 35: Fonds d'œil du beagle HOG3700*



*Fond d'œil à droite*

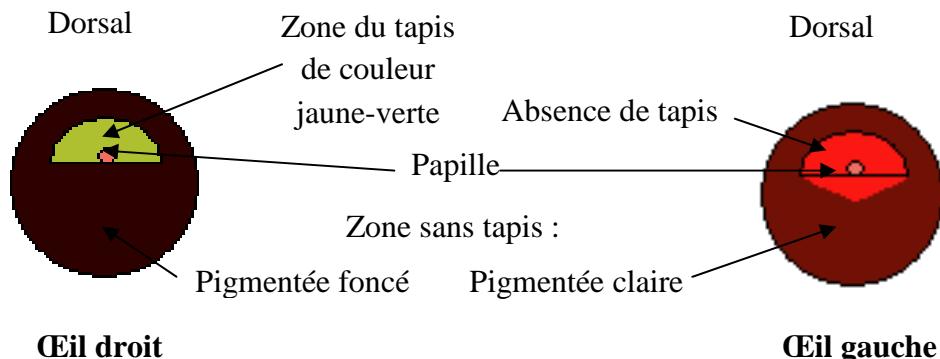


*Fond d'œil à gauche*

*Source des photos : Unité d'ophtalmologie, CHUVA, ENVA*

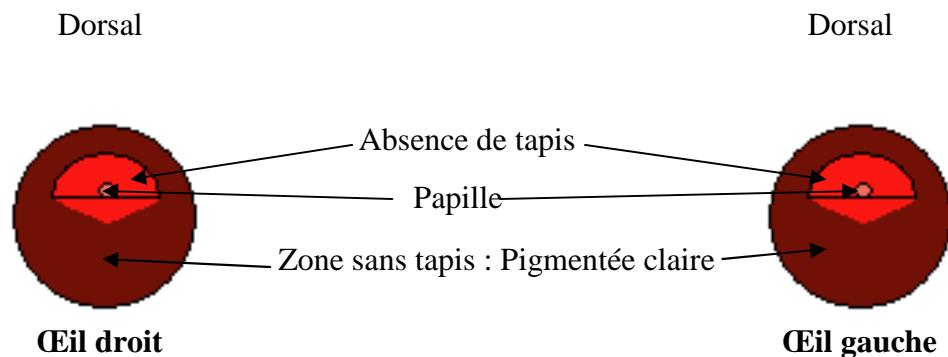
Les fonds d'œil à droite des beagles 1907192NYAA et H2E0725 possédaient une zone du tapis de couleur jaune-vert et une zone sans tapis pigmentée de couleur marron foncé. Les fonds d'œil à gauche des beagles 1907192NYAA et H2E0725 présentaient une zone dépigmentée en position dorsale avec absence de tapis, de couleur rouge, laissant apparaître les vaisseaux de la choroïde et une zone sans tapis pigmentée qui était plus claire que la zone sans tapis de l'œil controlatéral. (*Figure 36*)

*Figure 36: Schémas du fond d'œil des beagles 1907192NYAA et H2E0725*



Les fonds d'œil à droite et gauche des beagles 1927312NYAA et NEO présentaient une zone dépigmentée en position dorsale avec absence de tapis, de couleur rouge, laissant apparaître les vaisseaux de la choroïde et une zone sans tapis pigmentée qui était plus claire que la zone sans tapis de l'œil controlatéral. (*Figure 37*)

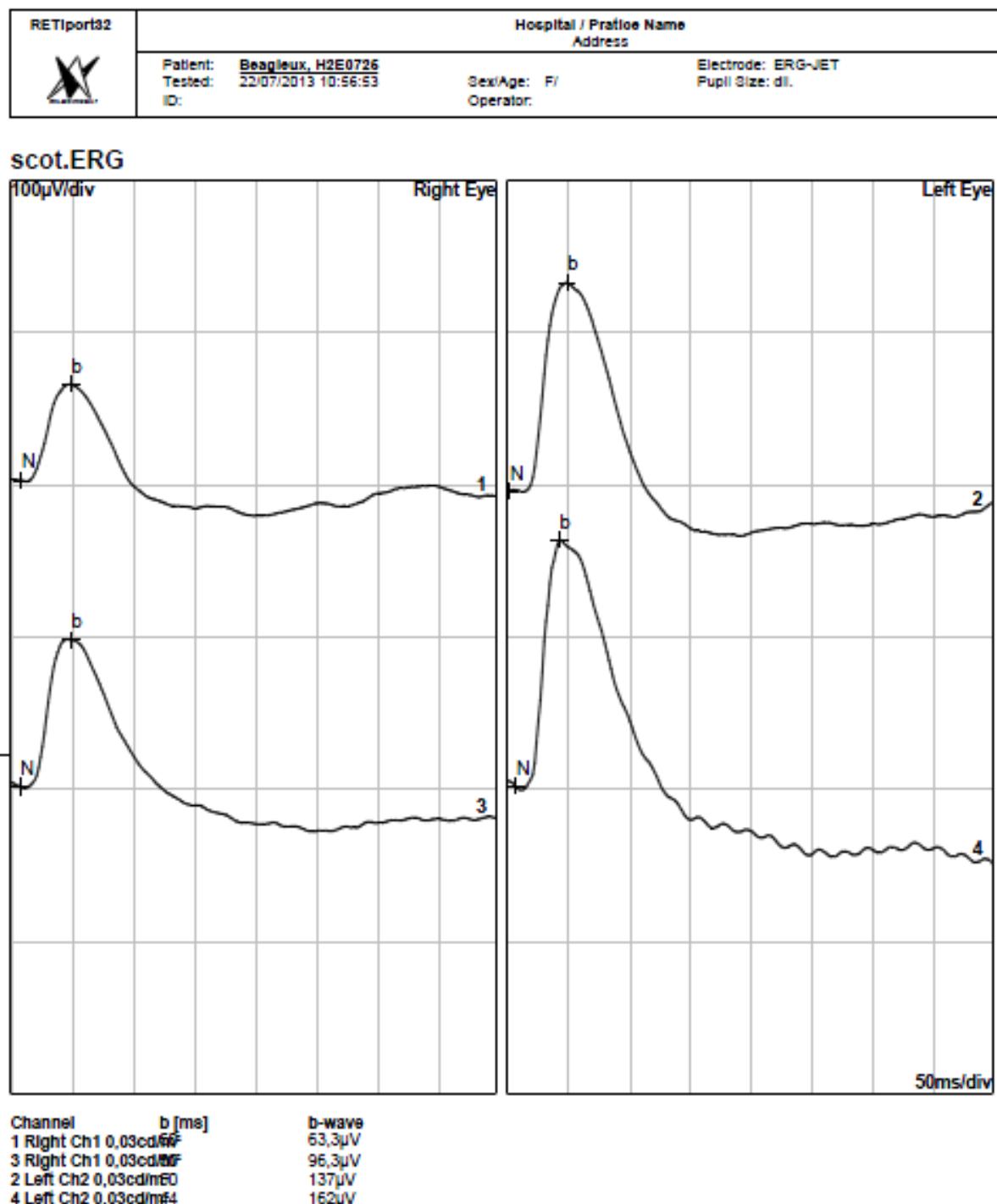
*Figure 37: Schémas des fonds d'œil des beagles 1927312NYAA et NEO*



### III.1.2. Examen ERG

Les résultats de l'ERG sont présentés sous forme de courbe (*Figure 38, Figure 39*) et permettaient d'obtenir différentes valeurs (amplitude des ondes a et b et temps de culmination des ondes a et b) en fonction de l'ambiance scotopique et de l'intensité du flash. Les résultats sont résumés dans les tableaux ci-dessous (*Tableau 6, Tableau 8, Tableau 10, Tableau 12*).

Figure 38 : Courbe obtenue aux cours de l'examen ERG de H2E0725 en ambiance scotopique



Courbe 1 : obtenue pour l'œil droit en scotopique sans adaptation.

Courbe 3 : obtenue pour l'œil droit en scotopique avec adaptation.

Courbe 2 : obtenue pour l'œil gauche en scotopique sans adaptation.

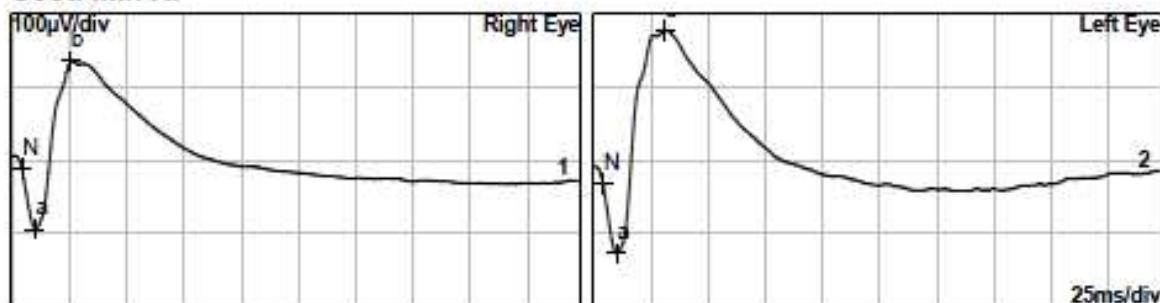
Courbe 4 : obtenue pour l'œil gauche en scotopique avec adaptation.

b : onde b, N : ligne de base

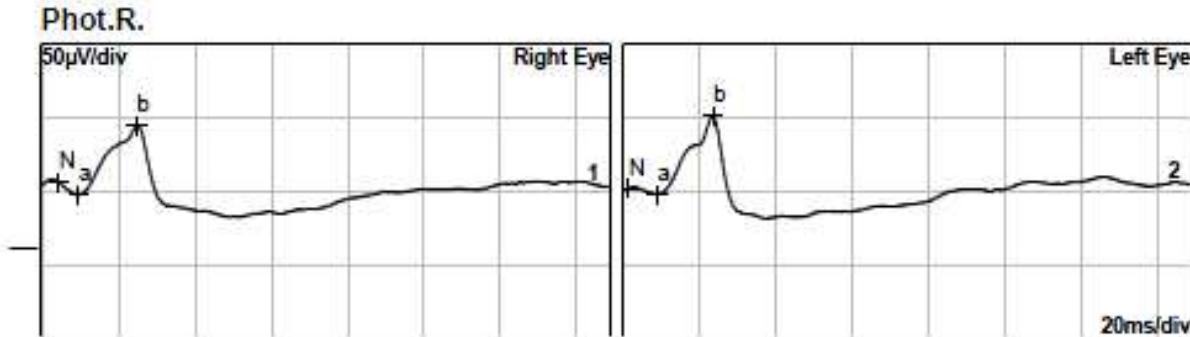
Figure 39 : Courbe obtenue aux cours de l'examen ERG de H2E0725 en ambiance photopique

RETIport32	Hospital / Practice Name Address		
	Patient: Beagleux, H2E0725 Tested: 22/07/2013 10:56:53 ID:	Sex/Age: F/ Operator:	Electrode: ERG-JET Pupil Size: dil.

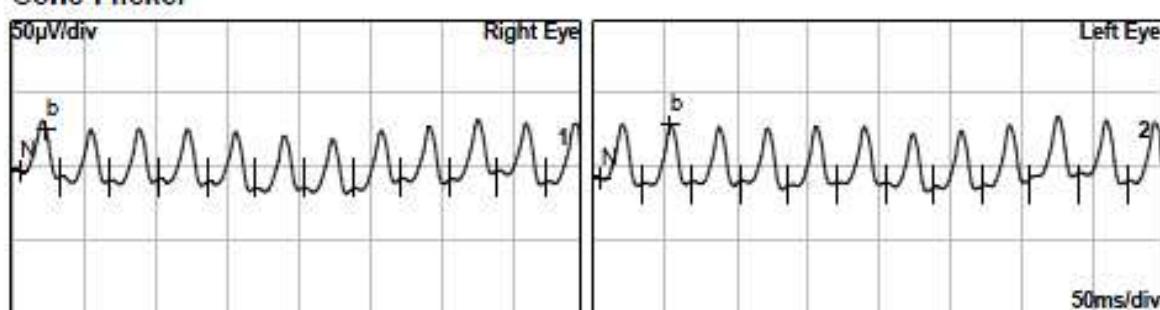
### Scot. Mix R.



### Phot.R.



### Cone Flicker



Courbe en haut à droite : obtenue pour l'œil droit en scotopique à 3cds/m<sup>2</sup>.

Courbe en haut à gauche : obtenue pour l'œil gauche en scotopique à 3cds/m<sup>2</sup>.

Courbe au milieu à droite: obtenue pour l'œil droit en photopique.

Courbe au milieu à gauche : obtenue pour l'œil gauche en photopique.

Courbe en bas à droite : obtenue pour l'œil droit en flicker.

Courbe en bas à gauche : obtenue pour l'œil gauche en flicker.

b : onde b, a : onde a, N : ligne de base

Les différents types d'œil ont pu être rangées en 3 lots :

- œil avec iris de couleur marron et avec un fond d'œil pigmenté avec tapis (œil majoritairement présent chez le beagle) : lot témoin ;
- œil avec iris de couleur bleue et avec un fond d'œil peu pigmenté sans tapis : lot subalbinos sans tapis ;
- œil avec iris hétérochromique de couleur bleue et marron et avec un fond d'œil peu pigmenté avec tapis : lot subalbinos avec tapis.

Seuls les deux premiers lots ont pu être comparés, le troisième lot ne contenant que deux yeux. Les résultats de l'amplitude de l'onde b sont présentés dans le *Tableau 6*.

*Tableau 6 : Résultats des ERG pour l'amplitude de l'onde b*

Amplitude de l'onde b (microvolts)						
Lot témoins						
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
<b>Intensité Flash cds/m2</b>		0,03	0,03	3	3	3
<b>Chien</b>	<b>Fond d'œil</b>					
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	63,3	96,3	228,0	47,5	34,0
H9L2210- OG	pigmenté avec tapis	20,9	38,6	98,5	33,2	17,1
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	161	103	135	33,4	32,4
HOG3700- OG	pigmenté avec tapis	56,4	95,5	183	28,6	18
HOB2357- OG	pigmenté avec tapis	106	133	238	37,9	13,8
H2F1068- OG	pigmenté avec tapis	39	48,9	216	37,1	36,2
<b>Moyenne</b>		<b>74,43</b>	<b>85,88</b>	<b>183,08</b>	<b>36,28</b>	<b>25,25</b>
<b>Écart-type</b>		<b>51,11</b>	<b>35,55</b>	<b>55,83</b>	<b>6,42</b>	<b>9,98</b>

Lot subalbinos sans tapis						
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
<i>Intensité Flash cds/m2</i>		0,03	0,03	3	3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>					
H2E0725 OG	peu pigmenté sans tapis	137	162	303	53,2	36,5
H9L2210-OD	peu pigmenté sans tapis	21,7	30,6	87,6	11,7	6,93
Falcon-OD	dépigmenté sans tapis	165	110	225	37,8	33,5
HOG3700-OD	peu pigmenté sans tapis	83,4	124	169	30,6	21
HOB2357-OD	peu pigmenté sans tapis	83,5	110	161	38,8	33,5
Atchoum-OD	dépigmenté sans tapis	71,4	129	269	32	31
Atchoum-OG	dépigmenté sans tapis	76,2	122	248	8,7	8,12
H2F1068-OD	modérément pigmenté sans tapis	15,8	21	135	27,3	30,4
<b>Moyenne</b>		<b>81,75</b>	<b>101,08</b>	<b>199,70</b>	<b>30,01</b>	<b>25,12</b>
<b>Écart-type</b>		<b>50,82</b>	<b>49,27</b>	<b>73,33</b>	<b>14,52</b>	<b>11,77</b>

Lot subalbinos avec tapis						
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		0,03	0,03	3	3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>					
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	48,8	65,9	203	41,9	30,8
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	31,7	47,8	114	26,5	8,27
<b>Moyenne</b>		<b>40,25</b>	<b>56,85</b>	<b>158,50</b>	<b>34,20</b>	<b>19,54</b>
<b>Écart-type</b>		<b>12,09</b>	<b>12,80</b>	<b>62,93</b>	<b>10,89</b>	<b>15,93</b>

OD : œil droit, OG : œil gauche.

Les moyennes du lot témoin et du lot subalbinos avec tapis pour l'amplitude de l'onde b ont été comparées avec le test U de Mann Whitney et les résultats du test ont montré que  $p > 0,05$  (*Tableau 7*). En conclusion, les moyennes de ces deux lots n'étaient pas significativement différentes.

*Tableau 7 : Test U de Mann Whitney pour l'amplitude de l'onde b*

	<i>Scotopique sans adaptations (0,3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Scotopique avec adaptation (0,3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Scotopique (3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Valeur de Z	0,516	0,904	0,452	0,904	0,129
Valeur de p	0,6056	0,3662	0,6514	0,3662	0,8973

Les résultats du temps de culmination de l'onde b sont présentés dans le *Tableau 8*.

Tableau 8 : Résultats des ERG pour le temps de culmination de l'onde b

Temps Culmination de l'onde b (ms)					
Lot témoins					
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		0,03	0,03	3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>				
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	55	50	32	28
H9L2210-OG	pigmenté avec tapis	56	50	34	26
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	50	50	26	25
HOG3700-OG	pigmenté avec tapis	52	52	36	25
HOB2357-OG	pigmenté avec tapis	41	53	32	24
H2F1068-OG	pigmenté avec tapis	44	52	27	25
<b>Moyenne</b>		<b>49,67</b>	<b>51,17</b>	<b>31,17</b>	<b>25,50</b>
<b>Écart-type</b>		<b>6,02</b>	<b>1,33</b>	<b>3,92</b>	<b>1,38</b>
					<b>17,77</b>

<b>Lot subalbinos sans tapis</b>						
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
<b>Intensité Flash cds/m2</b>		0,03	0,03	3	3	3
<b>Chien</b>	<b>Fond d'œil</b>					
Falcon-OD	dépigmenté sans tapis	50	50	32	30	60
H9L2210-OD	peu pigmenté sans tapis	53	50	34	27	25
H2E0725 OG	peu pigmenté sans tapis	50	44	32	24	55
HOG3700-OD	peu pigmenté sans tapis	47	53	35	26	56
HOB2357-OD	peu pigmenté sans tapis	52	49	25	26	25
Atchoum-OD	dépigmenté sans tapis	49	44	35	26	27
Atchoum-OG	dépigmenté sans tapis	52	50	35	31	38
H2F1068-OD	modérément pigmenté sans tapis	41	42	26	26	58
<b>Moyenne</b>		<b>49,25</b>	<b>47,75</b>	<b>31,75</b>	<b>27,00</b>	<b>43,00</b>
<b>Écart-type</b>		<b>3,85</b>	<b>3,88</b>	<b>4,06</b>	<b>2,33</b>	<b>15,84</b>

<b>Lot subalbinos sans tapis</b>						
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		0,03	0,03	3	3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>					
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	47	49	33	26	56
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	49	52	36	25	56
<b>Moyenne</b>		<b>48,00</b>	<b>50,50</b>	<b>34,50</b>	<b>25,50</b>	<b>56,00</b>
<b>Écart-type</b>		<b>1,41</b>	<b>2,12</b>	<b>2,12</b>	<b>0,71</b>	<b>0,00</b>

OD : œil droit, OG : œil gauche.

Les moyennes du lot témoin et du lot subalbinos avec tapis pour le temps de culmination de l'onde b ont été comparées avec le test U de Mann Whitney et les résultats du test ont montré que  $p > 0,05$  (*Tableau 9*). En conclusion, les moyennes de ces deux lots n'étaient pas significativement différentes.

*Tableau 9 : Test U de Mann Whitney pour le temps de culmination de l'onde b*

	<i>Scotopique sans adaptations (0,3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Scotopique avec adaptation (0,3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Scotopique (3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Valeur de Z	0,452	1,807	0,258	1,485	0,710
Valeur de p	0,6514	0,0707	0,7963	0,1376	0,4777

Les résultats de l'amplitude de l'onde a sont présentés dans le *Tableau 10*.

Tableau 10 : Résultats des ERG pour l'amplitude de l'onde a

<b>Amplitude de l'onde a (microvolts)</b>			
<b>Lot témoin</b>			
<i>Ambiance</i>	<i>Fond d'œil</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	81,8	8,58
H9L2210- OG	pigmenté avec tapis	49,5	5,15
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	55,6	7,57
HOG3700- OG	pigmenté avec tapis	63,5	4,8
HOB2357- OG	pigmenté avec tapis	70,1	3,98
H2F1068- OG	pigmenté avec tapis	82,5	6,22
<b>Moyenne</b>		<b>67,17</b>	<b>6,05</b>
<b>Écart-type</b>		<b>13,54</b>	<b>1,75</b>
<b>Lot subalbinos sans tapis</b>			
<i>Ambiance</i>	<i>Fond d'œil</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OG	peu pigmenté sans tapis	95,5	3,81
H9L2210- OD	peu pigmenté sans tapis	47,2	6,55
Falcon-OD	dépigmenté sans tapis	105	19,7
HOG3700- OD	peu pigmenté sans tapis	64,1	10,3
HOB2357- OD	peu pigmenté sans tapis	83,2	11,9
Atchoum- OD	dépigmenté sans tapis	129	17,6
Atchoum- OG	dépigmenté sans tapis	111	4,89
H2F1068- OD	modérément pigmenté sans tapis	54,2	5,9
<b>Moyenne</b>		<b>86,15</b>	<b>10,08</b>
<b>Écart-type</b>		<b>29,10</b>	<b>5,96</b>

<b>Lot subalbinos avec tapis</b>			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<b>Intensité Flash cds/m2</b>		3	3
<b>Chien</b>	<b>Fond d'œil</b>		
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	86,9	9,72
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	46,1	2,94
	<b>Moyenne</b>	<b>66,5</b>	<b>6,33</b>
	<b>Écart-type</b>	<b>28,85</b>	<b>4,79</b>

*OD : œil droit, OG : œil gauche.*

Les moyennes du lot témoin et du lot subalbinos avec tapis pour l'amplitude de l'onde a ont été comparées avec le test U de Mann Whitney et le résultat du test ont montré que  $p > 0,05$  (*Tableau 11*). En conclusion, les moyennes de ces deux lots n'étaient pas significativement différentes.

*Tableau 11 : Test U de Mann Whitney pour l'amplitude de l'onde a*

	<i>Scotopique (3 cds/m2)</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Valeur de Z	1,291	1,162	0,129
Valeur de p	0,1967	0,2453	0,8973

Les résultats du temps de culmination de l'onde a sont présentés dans le *Tableau 12*.

Tableau 12: Résultats des ERG pour le temps de culmination de l'onde a

<b>Temps Culmination de l'onde a (ms)</b>			
<b>Lot témoins</b>			
<i>Ambiance</i>	<i>Fond d'œil</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	11	10
H9L2210- OG	pigmenté avec tapis	12	7
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	12	11
HOG3700- OG	pigmenté avec tapis	14	9
HOB2357- OG	pigmenté avec tapis	12	11
H2F1068- OG	pigmenté avec tapis	12	10
<b>Moyenne</b>		<b>12,17</b>	<b>9,67</b>
<b>Écart-type</b>		<b>0,98</b>	<b>1,51</b>
<b>Lot subalbinos sans tapis</b>			
<i>Ambiance</i>	<i>Fond d'œil</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OG	peu pigmenté sans tapis	11	9
H9L2210- OD	peu pigmenté sans tapis	12	10
Falcon-OD	dépigmenté sans tapis	12	11
HOG3700- OD	peu pigmenté sans tapis	12	12
HOB2357- OD	peu pigmenté sans tapis	13	11
Atchoum- OD	dépigmenté sans tapis	12	12
Atchoum- OG	dépigmenté sans tapis	12	18
H2F1068- OD	modérément pigmenté sans tapis	12	11
<b>Moyenne</b>		<b>12,00</b>	<b>11,75</b>
<b>Écart-type</b>		<b>0,53</b>	<b>2,71</b>

<b>Lot subalbinos avec tapis</b>			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m<sup>2</sup></i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	11	11
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	12	9
<b>Moyenne</b>		<b>11,50</b>	<b>10,00</b>
<b>Écart-type</b>		<b>0,71</b>	<b>1,41</b>

*OD : œil droit, OG : œil gauche.*

Les moyennes du lot témoin et du lot subalbinos avec tapis pour le temps de culmination de l'onde a ont été comparées avec le test U de Mann Whitney et les résultats du test ont montré que  $p > 0,05$ . (*Tableau 13*). En conclusion les moyennes de ces deux lots n'étaient pas significativement différentes.

*Tableau 13 : Test U de Mann Whitney pour le temps de culmination de l'onde a*

	<i>Scotopique (3 cds/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Valeur de Z	0,065	1,743	0,710
Valeur de p	0,9485	0,0814	0,4777

Ainsi, les moyennes des valeurs obtenues sur les amplitudes et le temps de culmination des ondes a et b n'étaient pas significativement différentes entre les yeux témoins et les yeux subalbinos sans tapis.

### III.2. Pelage

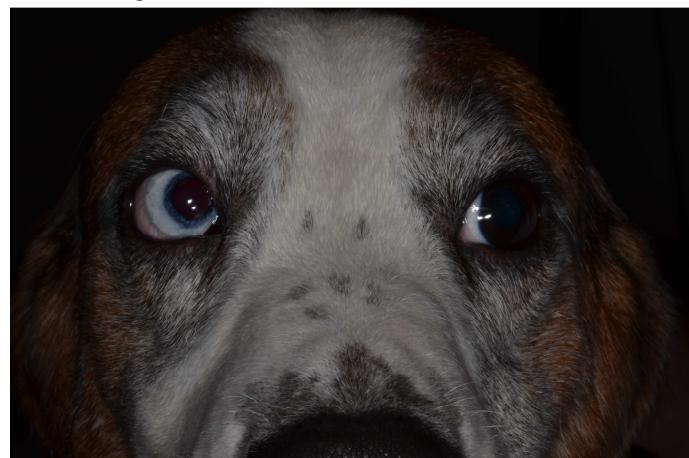
Pour tous les chiens ayant au moins un œil bleu, le contour du pelage autour des yeux a été regardé. (*Tableau 14*)

*Tableau 14: Pelage autour des yeux des beagles ayant au moins un œil bleu*

Nom / Tatouage	Sexe	Elevage	Couleur des yeux	Pelage autour de l'œil droit	Pelage autour de l'œil gauche
<b>DUMBO</b> H9L2210	Mâle	Harlan	Yeux Vairons : œil droit bleu œil gauche marron	Marron	Marron
<b>SAPHIR</b> <b>(BEAUGOSSE)</b> H0B2628	Mâle	Harlan	Yeux Bleus hétérochromique	Marron	Blanc autour du canthus nasal Marron autour du canthus temporal
<b>BALOU</b> H0G3700	Mâle	Harlan	Yeux Vairons : œil droit bleu œil gauche marron	Gris ( <i>Figure 40</i> )	Gris ( <i>Figure 40</i> )
<b>FALCON</b> 730 48 71	Mâle	Marshall Italie	Yeux Vairons : œil droit bleu œil gauche marron	Marron	Marron
<b>TURQUOISE</b> H0B2357	Femelle	Harlan	Yeux Vairons : œil droit bleu œil gauche marron	Marron	Marron
<b>ATCHOUM</b> 1927312 NYAA	Mâle	Marshall USA	Yeux bleus	Blanc	Blanc
<b>BARBIE</b> 1907192 NYAA	Femelle	Marshall USA	Yeux Vairons : œil gauche bleu œil droit marron	Blanc ( <i>Figure 41</i> )	Blanc ( <i>Figure 41</i> )
<b>NEO</b>	Mâle	ENVA	Yeux bleus	Marron	Marron
<b>Chiot de turquoise (mâle 2)</b>	Mâle	ENVA	Yeux vairon : œil droit gris œil gauche bleu	Blanc autour du canthus nasal Sinon Marron ( <i>Figure 42</i> )	Marron ( <i>Figure 42</i> )
<b>Chiot de turquoise (mâle 4)</b>	Mâle	ENVA	yeux vairons : œil droit gris œil gauche marron	Blanc autour du canthus nasal Sinon Marron	Marron

<b>Chiot de turquoise (femelle)</b>	Femelle	ENVA	Yeux vairon : œil droit gris œil gauche bleu hétérochromie	Marron ( <i>Figure 43</i> )	Marron ( <i>Figure 43</i> )
<b>WIKI</b> H2E0725	Femelle	Harlan	Yeux Vairons : œil droit marron œil gauche bleu	Marron	Marron
<b>KAWAI</b> H2F1068	Mâle	Harlan	Yeux Vairons : œil droit bleu œil gauche marron	Marron	Marron
<b>KIWI</b> H2F1072	Mâle	Harlan	Yeux Bleus hétérochromique	Marron	Marron

*Figure 40 : Photo du chien HOG3700*



*Figure 41 : Photo du chien 1907192NYAA*



*Figure 42 : Photo du chiot mâle de Turquoise-Saphir*



*Figure 43 : Photo du chiot femelle de Turquoise-Saphir*

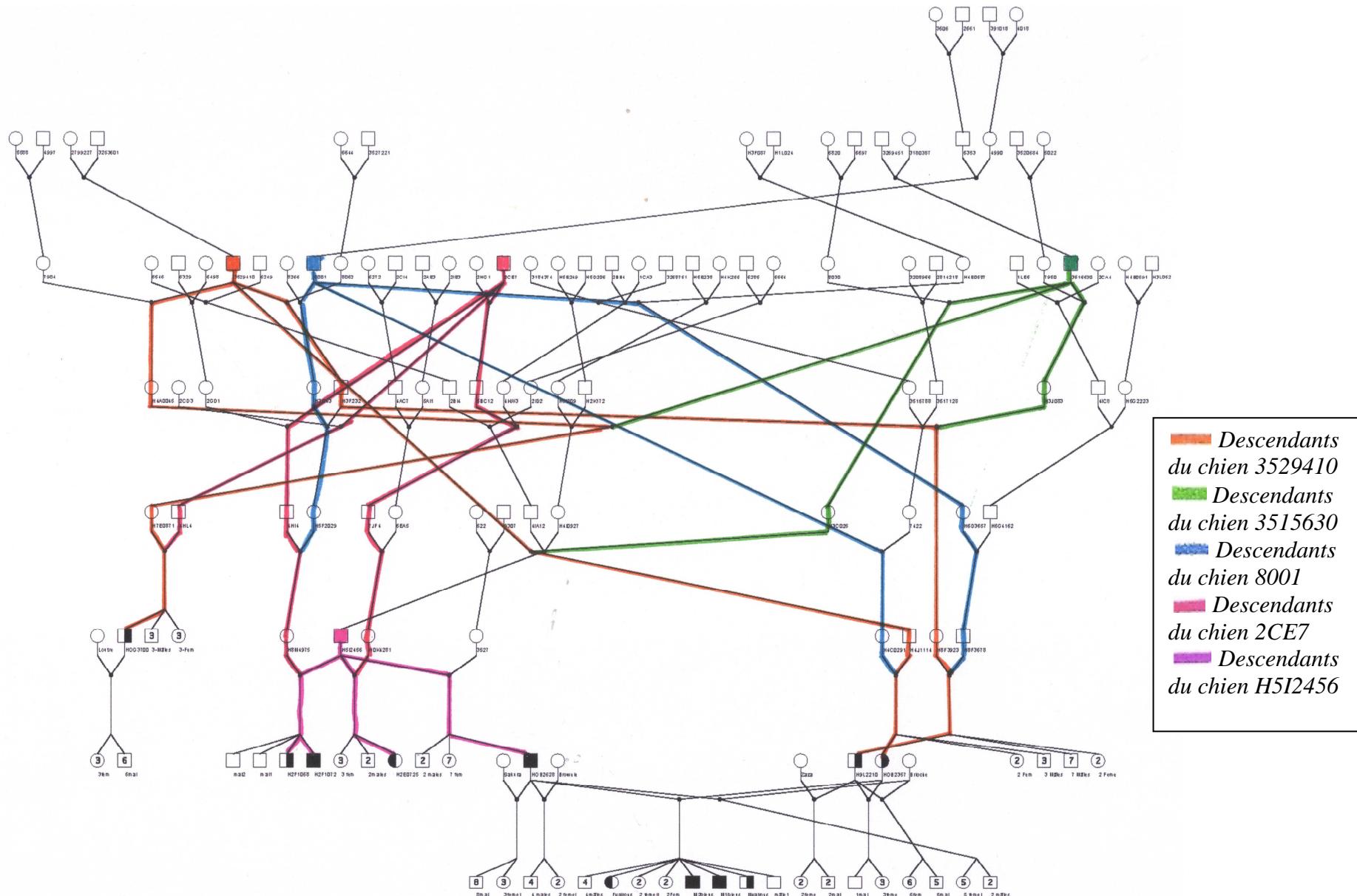


## **III.3. Génétique**

### **III.3.1. Identification du mode de transmission**

L'arbre généalogique a montré le lien entre les chiens aux yeux bleus qui provenaient de l'élevage de Harlan et des différents croisements réalisés à l'ENVA. (*Figure 44*)

Figure 44 : Arbre généalogique des beagles provenant de l'élevage Harlan



*Légende de l'arbre : les carrés représentent les mâles, les ronds les femelles. Les chiens aux deux yeux bleus sont noircis, les chiens avec un œil bleu présentent un symbole à demi noirci (noir du côté de l'œil bleu). Les nombres dans les symboles indiquent le nombre de mâles et de femelles produits.*

Dans l'élevage de Harlan, les chiens ayant au moins un œil bleu avaient 4 descendants qui revenaient souvent. H9L2210 (Dumbo) avait comme arrière grands-parents les chiens 8001, 3515630, 3529410 qui était des descendants de H0B2357 (Turquoise). H0G3700 (Balou) avait comme descendants les chiens 3515630 et 3529410 (communs à Turquoise et Dumbo). De plus, le mâle H5I2456 avait eu 4 chiots ayant au moins un œil bleu avec 3 femelles différentes. De plus les mères de 3 de ces 4 chiots avaient comme descendant 2CE7 qui était présent dans la généalogie de Balou. Et pour deux de ces chiots, ils avaient comme descendant 8001 qui était également présent chez Turquoise et Dumbo. Il existait donc de nombreux liens de parenté entre les beagles présentant au moins un œil bleu.

Dans le but de confirmer un mode de transmission du caractère « yeux bleus », différents croisements de chiens ont été réalisés à l'école d'Alfort. (*Tableau 15*) Les croisements d'un chien aux yeux vairons et d'un chien aux yeux bleus ont donné 69% de chiots aux deux yeux de couleur marron, 8% de chiots aux deux yeux bleus et 23% de chiens aux yeux vairons. Le croisement d'un chien aux yeux marron avec un chien ayant au moins un œil bleu a donné 0% de chiens aux yeux bleus. Le croisement de deux chiens aux yeux vairons a donné 0 % de chiots aux yeux bleus.

Tableau 15 : Croisements réalisées à l'ENVA

Mère	Yeux	Père	Yeux	Date Naissance Chiots	Nb chiots vivants	Couleur des yeux des chiots
ZAZA	Marron	DUMBO	Vairons	16/05/2011	2 femelles / 2 mâles	Marron
SAKURA	Marron	BEAUGOSSE	2 yeux bleus	29/06/2011	1 femelles / 5 mâles	Marron
LOUTRE	Marron	BALOU	Vairons	03/07/2011	3 femelles / 6 mâles	Marron
TURQUOISE	Vairons	DUMBO	Vairons	12/08/2011	3 femelles / 1 mâle	Marron
BRIOCHE	Marron	DUMBO	Vairons	16/12/2011	6 femelles / 5mâles	Marron
SAKURA	Marron	BEAUGOSSE	2 yeux bleus	29/01/2012	2 femelles / 3 mâles	Marron
TURQUOISE	Vairons	BEAUGOSSE	2 yeux bleus	25/04/2012	2 femelles / 4 mâles	Femelles : 2 Marron Mâles : 1 Marron 1 Bleu 2 Vairons ; bleu/grisvert marron/grisvert
TURQUOISE	Vairons	BEAUGOSSE	2 yeux bleus	07/01/2013	3 femelles/ 4 mâles	1 Vairons bleu/grisvert 2 Femelles : marron 4 Mâles : marron
BRIOCHE	Marron	BEAUGOSSE	2 yeux bleus	10/07/2012	5 femelles / 2 mâles	Marron
BROWNIE	Marron	BEAUGOSSE	2 yeux bleus	22/06/2013	2 femelles / 4 mâles	Marron

Le croisement d'un chien aux yeux marron et d'un chien ayant au moins un œil bleu ne donnait pas de chiens aux yeux bleus. Si la transmission était autosomique dominante à pénétrance complète, il y aurait eu 50 % des chiots avec au moins un œil bleu. De plus, l'élevage de Harlan ne fait reproduire que des chiens ayant les deux yeux marron et pourtant de temps en temps dans une portée, un chien ayant au moins un œil bleu naît. Donc la transmission autosomique dominante à pénétrance complète a pu être écartée.

Le mode de transmission n'était pas lié à l'Y car des femelles avaient des yeux bleus.

Le mode de transmission n'était pas lié à l'X dominant car des femelles ayant un père aux yeux bleus pouvaient avoir des yeux marron.

Le mode de transmission n'était pas lié à l'X récessif car des mâles ayant une mère aux yeux vairon pouvaient avoir des yeux marron.

Le croisement d'un chien aux yeux vairons et d'un chien aux yeux bleus ne donnait pas 100% des chiens ayant au moins un œil bleu mais 31% ayant au moins un œil bleu. Donc la transmission autosomique récessive a pu être exclue.

Les deux types de transmission possibles étaient donc autosomique dominante à pénétrance incomplète ou polygénique.

### **III.3.2. Recherche de gènes candidats chez le chien pour la couleur bleue des yeux**

Les gènes responsables de la couleur des yeux chez l'homme sont assez bien connus. Ainsi, ces gènes connus chez l'homme ont été recherchés chez le chien pour voir s'ils pouvaient jouer un rôle dans la couleur des yeux chez le beagle.

Chez l'homme, la transmission génétique de la couleur des yeux est polygénique. Les gènes potentiellement responsables seraient *OCA2/HERC2*, *SLC2A4*, *TYR*, *TYRP1*, *SCL45A2*, *IRF4*, *LYST* et *DSCR9* (ce dernier gène existant uniquement chez les primates). La région *OCA2/HERC2* serait le principal déterminant de la couleur des yeux. Ainsi, nous avons limité notre étude aux gènes *OCA2* et *HERC2* pour la recherche des gènes candidats canins.

Dans la base de données Ensembl (19) se trouve la séquence complète du génome du chien. Les gènes *OCA2* et *HERC2* y étaient présents et situés sur le chromosome 3 canin.

Le gène *OCA2* possède 22 exons chez le chien alors que chez l'homme il en possède 24 (19). En effet, les deux premiers exons du gène *OCA2* sont manquants dans la base de données Ensembl chez le chien (19).

Chez l'homme, trois SNP dans l'intron 1 ont été identifiés comme associés à la couleur des yeux. Ainsi, pour déterminer si la région de l'intron 1 de l'homme était conservée chez le chien, l'utilitaire BLAST (40) a permis de rechercher la séquence homologue de l'intron 1 d'*OCA2* humain dans le génome du chien. Aucun résultat n'a été trouvé ; nous pouvons penser qu'il y avait peu de conservation entre le chien et l'homme en ce qui concerne l'intron 1 d'*OCA2*, ou bien que cette région n'a pas été correctement séquencée chez le chien et qu'elle n'est donc pas présente dans la base de données.

Le gène *HERC2* a été décrit avec 94 exons chez le chien et 93 chez l'homme. La comparaison des séquences de *HERC2* humain et canin a permis de supposer que le chien avait un exon n°1 en plus par rapport à l'homme. Ainsi, il y avait un décalage entre les exons et introns de l'homme et du chien et donc l'exon 1 chez l'homme correspondait à l'exon 2 chez le chien. Chez l'homme, quatre SNP dans le gène *HERC2* ont été associés à la couleur des yeux : un SNP dans l'intron 86, un dans le 3'UTR, un dans l'intron 4 et un dans l'intron 12.

Le logiciel Multalin (13) a permis de confirmer que l'intron 86 chez l'homme correspondait à l'intron 85 chez le chien et a permis d'identifier une région conservée entre l'homme et le chien (*Figure 45*), en particulier au niveau de la position du SNP rs12913832 humain (*Figure 46*). Ainsi, cette région était candidate pour la couleur bleue des yeux chez le beagle.

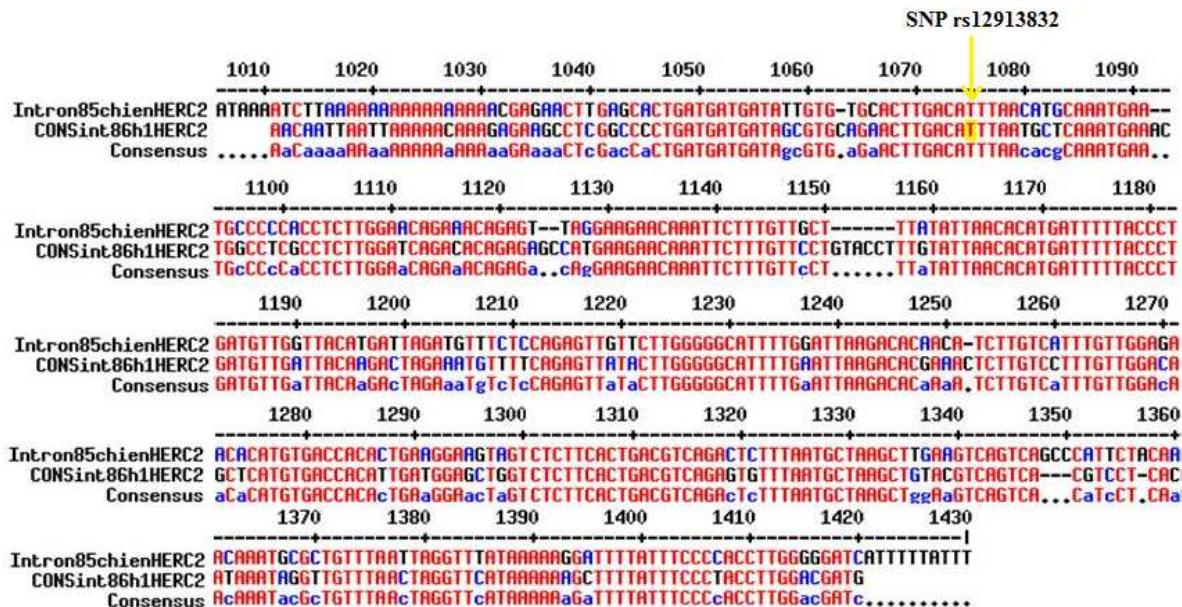
Figure 45 : Alignement entre l'intron 86 de l'homme et l'intron 85 du chien du gène HERC2

The figure displays a sequence alignment between Human Intron 86 (HERC2) and Canine Intron 85 (HERC2). The alignment is presented in two columns, with the Human sequence on the left and the Canine sequence on the right. Above the sequences, a consensus sequence is shown, followed by the Human and Canine sequences. The alignment is numbered from 1 to 3120. The Human sequence is color-coded: black for A, red for T, blue for C, and green for G. The Canine sequence is also color-coded. The alignment shows high conservation between the two species, with many identical or highly similar nucleotides. The Human sequence contains several stop codons (TAA, TGA, TGT) and a poly-A tail (AATAAA).



Les *lettres rouges* montrent les nucléotides conservés entre le chien et l'homme et les *lettres bleues* montrent les nucléotides différents entre le chien et l'homme. La première ligne correspond à la séquence du chien et la deuxième ligne correspond à la séquence de l'homme.

Figure 46 : Zone très conservée de *HERC2* entre le chien et l'homme autour du SNP rs12913832



Les *lettres rouges* montrent les nucléotides conservés entre le chien et l'homme et les lettres *bleues* montrent les nucléotides différents entre le chien et l'homme. La lettre *surlignée en jaune* montre la position du SNP rs12913832 chez l'homme. La première ligne correspond à la séquence du chien et la deuxième ligne correspond à la séquence de l'homme.

L'utilisation du logiciel BAST n'a pas pu permettre d'identifier la région homologue du 3'UTR de l'homme dans le génome du chien.

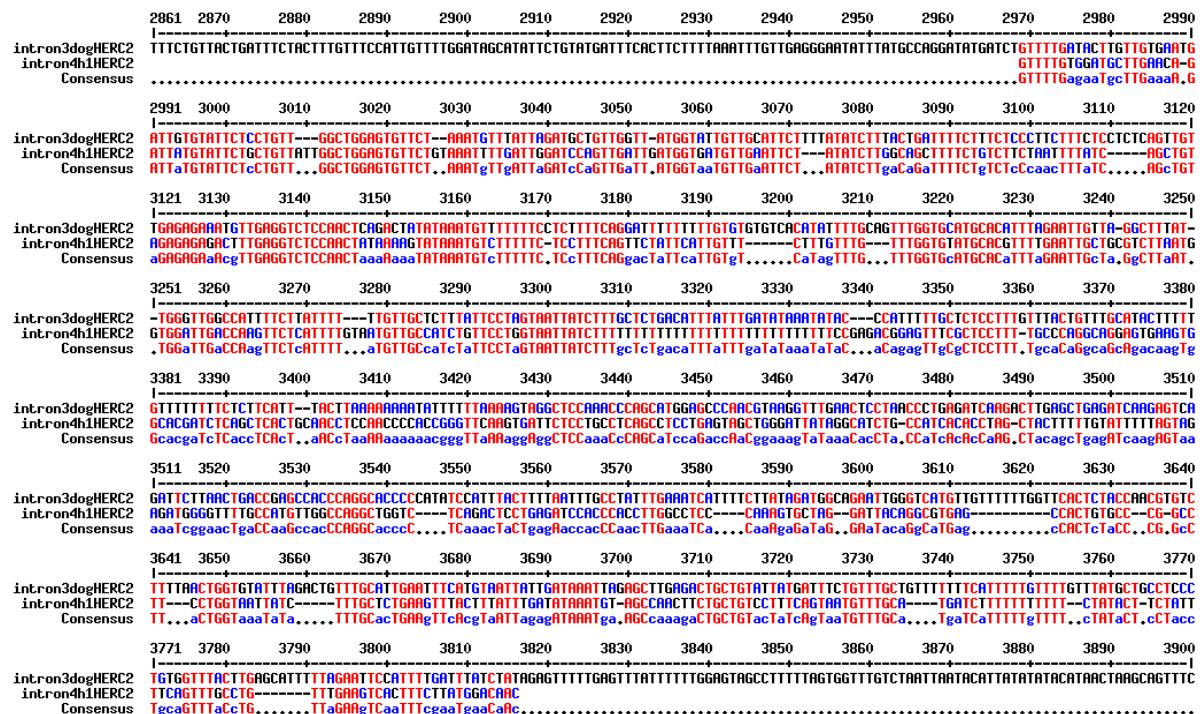
L'utilisation du logiciel Multalin (13) nous a également permis de mettre en évidence que l'intron 12 de l'homme était peu conservé par rapport à l'intron 11 du chien (*Figure 47*) et que l'intron 4 de l'homme était peu conservé par rapport à l'intron 3 correspondant du chien (*Figure 48*).

Figure 47 : Alignement entre l'intron 12 de l'homme et l'intron 11 du chien du gène HERC2

The figure displays a sequence alignment between the human intron 12 (HERC2) and the canine intron 11 (HERC2h1). The alignment is presented in two columns, with the human sequence on the left and the canine sequence on the right. Above the sequences, a scale bar indicates positions from 1 to 130 on the top row and 131 to 260 on the second row. Below the sequences, a scale bar indicates positions from 261 to 390 on the third row and 391 to 520 on the fourth row. The fifth row shows positions 521 to 650, the sixth row 651 to 780, the seventh row 781 to 910, the eighth row 911 to 1040, the ninth row 1041 to 1170, the tenth row 1171 to 1300, the eleventh row 1301 to 1430, the twelfth row 1431 to 1560, the thirteenth row 1561 to 1690, the fourteenth row 1691 to 1820, the fifteenth row 1821 to 1950, the sixteenth row 1951 to 2080, the seventeenth row 2081 to 2210, the eighteenth row 2211 to 2340, the nineteenth row 2341 to 2470, and the twentieth row 2471 to 2600. The alignment uses standard sequencing symbols: A, T, C, G for nucleotides, and ., , , - for gaps. Colored boxes highlight specific regions of interest: red for highly conserved regions, blue for moderately conserved regions, and green for less conserved regions. The consensus sequence is shown below each row.

Les *lettres rouges* montrent les nucléotides conservés entre le chien et l'homme et les *lettres bleues* montrent les nucléotides différents entre le chien et l'homme. La première ligne correspond à la séquence du chien et la deuxième ligne correspond à la séquence de l'homme.

Figure 48 : Alignement entre l'intron 4 de l'homme et l'intron 3 du chien du gène HERC2



Les *lettres rouges* montrent les nucléotides conservés entre le chien et l'homme et les *lettres bleues* montrent les nucléotides différents entre le chien et l'homme. La première ligne correspond à la séquence du chien et la deuxième ligne correspond à la séquence de l'homme.

Ainsi, les régions contenant les 3 autres SNP humains associés à la couleur de yeux étaient peu candidates pour la couleur yeux bleus chez le beagle.

### III.3.3. Amplification de la région sélectionnée

La région sélectionnée chez le chien pour le gène candidat se trouvait dans l'intron 85 et correspondait à la région très conservée entre le chien et l'homme. Elle incluait le SNP rs12913832 chez l'homme (*Figure 49*).

Figure 49 : Séquence du chien correspondant à la région très conservée entre l'homme et le chien dans l'intron 85 du chien.

ttgtccatgagggcagtteccatccaccaggctcatacgttctggctccatagcttcgtcccacttaatagaccagaatctaataact  
gttctctaggactggaggaatgaaaagttaggcattctgaattaataactactgccaagtatagataagcttaccattgaaaaatgaattaaaaa  
gaagagaaaggcagccagggtggctcaacagttagtgcgcctcagcccaggcatgtctggagacccaggatcgactcacacgtc  
aggetccctgcatggagctgtgtctccctgcctgtctgcctctctgtgttcatgaaataaaaataataataaaa  
atetcataaataaaatctaaaaaaaaaaaaacgagaacttgagactgtatgtgcactgacatttaacatgcaaataatgaaat  
gcccccaccttggAACAGAAACAGAGTTAGGAAGAACAAATTGTTGTGTTATATTAAACATGATTACCTGATGGTACATGATT  
AGATGTTCTCCAGAGTTGTTGGGGCATTTGGATTAGACACATTTGTCAATTGTTGGAGAACACATGTGACCACACTGAAGGAAGT  
AGTCCTCACTGACGTCAAGCTTAATGCAAGTGAAGTCAGCCCATTACAACAAATGCGCTGTTAATTGTTATAAAAAGG  
ATTTCATTCACCTGGGGCATTTTACTCTACATTACTAGGTATTAAACACTGAAGTTGTAAGTGAGGAAAGCTCAACTAACACAGA  
TGGTGGGCATCCTAGATCACATGCCCTGCCTGACATCACAGG

La séquence surlignée en jaune correspond à la région conservée entre le chien et l'homme. Les séquences surlignées en violet et vert correspondent aux amorces *Int85longF* et *Int85longR* utilisées pour la PCR et le séquençage.

À l'aide d'amorces, nous avons amplifié par PCR une portion de l'intron 85 de *HERC2* canin (912 pb). L'électrophorèse a montré une bande à environ 900 pb (Figure 50) ce qui correspondait au produit attendu et montré que la PCR avait bien amplifié la portion du génome voulu sans l'amplification parasite.

Figure 50 : Photographie du gel de vérification pour la PCR



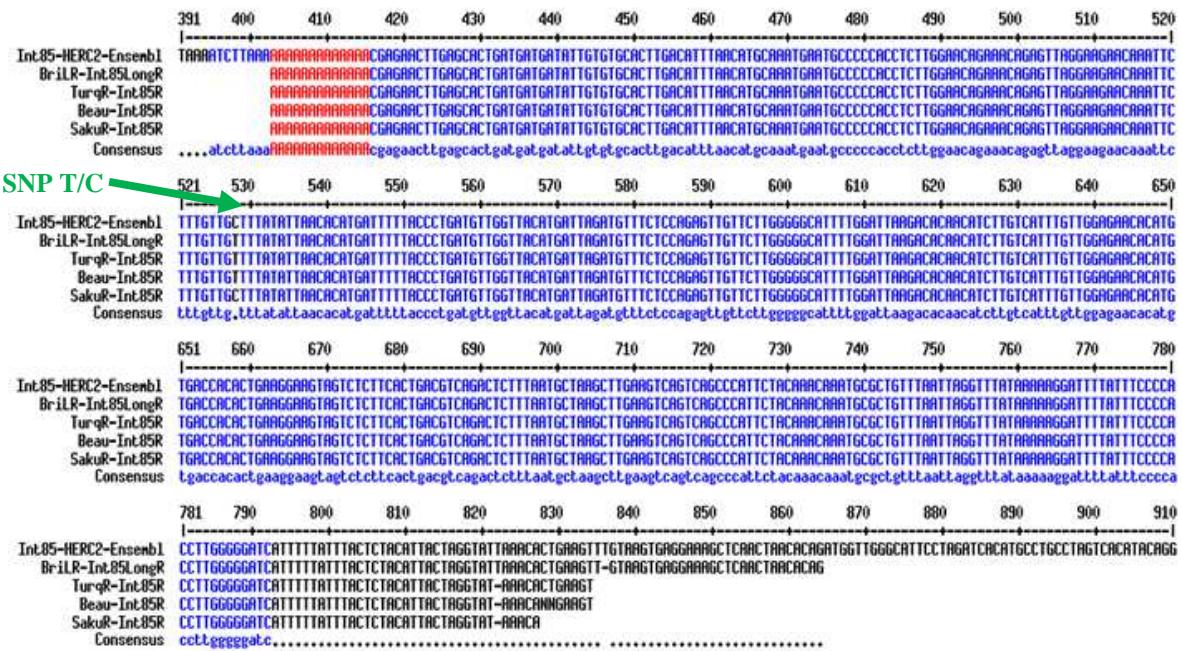
Une bande d'ADN est présente aux alentours de 900 pb. Le marqueur de taille à droite et à gauche produit des bandes tous les 100 pb à partir de 100 pb (bande du bas). Les puits de gauche à droite entre les marqueurs correspondent dans l'ordre aux chiens suivants : HOB2357, HOB2628, H9L2210, HOG3700, Loutre, Sakura, Brioche, chiot mâle de Turquoise-Dumbo, chiot femelle 1 de Turquoise-Dumbo, chiot femelle 1 de Brioche-Dumbo.

Les produits de PCR ont été envoyés au séquençage.

### III.3.4. Résultats du séquençage.

Pour comparer les séquences d'ADN entre les chiens aux yeux bleus et ceux aux yeux marron, des alignements de séquences ont été effectués à l'aide du logiciel Multalin. L'alignement de cinq séquences d'ADN (Turquoise, Saphir, Brioche, Sakura et la base de données Ensembl) de la région séquencée a montré qu'il y avait un SNP T/C en position 528. (*Figure 51*).

Figure 51 : Alignement de la région séquencée de l'ADN de Turquoise, Sakura, Saphir, Brioche et de la base de donnée Ensembl.



*La première ligne correspond à la séquence présente dans la base de données Ensembl, la deuxième ligne correspond à la séquence de Brioche dans le sens reverse, la troisième ligne correspond à la séquence de Turquoise dans le sens reverse, la quatrième ligne correspond à la séquence de Beaugosse dans le sens reverse et la cinquième ligne correspond à la séquence de Sakura dans le sens reverse. La flèche verte montre le SNP T/C.*

Les deux chiens aux yeux bleus avaient comme génotype T/C et un des chiens aux yeux marron avait aussi comme génotype T/C (*Tableau 16*).

Tableau 16 : Résultat du SNP trouvé en fonction de la couleur des yeux

Nom du chien	Couleur des yeux	Allèle
Turquoise	Vairon	T/C
Saphir	Bleus	T/C
Brioche	Marron	T/C
Sakura	Marron	C/C
Base de données Ensembl		C/C

 Chien ayant au moins un œil bleu.

Nous avons testé l'association éventuelle de ce SNP avec la couleur des yeux en génotypant tous les chiens disponibles.

### III.3.5. Résultats du génotypage

Le résultat du génotypage a montré qu'il n'y a pas d'association entre les allèles du SNP et la couleur des yeux chez les beagles analysés. En effet, les chiens aux yeux de couleur bleue pouvaient avoir comme génotype T/T, T/C ou C/C, de même que les chiens aux yeux de couleur marron. (*Tableau 17*)

Tableau 17 : Résultat du génotypage du SNP dans l'intron 85

Nom	Sexe	Mère/Père	Couleur des yeux	Génotype
Falcon	Mâle		Vairon	Echec
Turquoise	Femelle		Vairon	T/C
Beaugosse	Mâle		bleus	T/C
Balou	Mâle		Vairon	T/C
Dumbo	Mâle		Vairon	T/C
F 1 Turquoise	Femelle	Turquoise/Dumbo	Marron	C/C
F 2 Turquoise	Femelle	Turquoise/Dumbo	Marron	T/C
F 3 Turquoise	Femelle	Turquoise/Dumbo	Marron	T/C
M Turquoise	Femelle	Turquoise/Dumbo	Marron	T/T

Sakura	Femelle		Marron	C/C
M 1 Sakura	Mâle	Sakura/Beaugosse	Marron	T/C
M 2 Sakura	Mâle	Sakura/Beaugosse	Marron	C/C
M 3 Sakura	Mâle	Sakura/Beaugosse	Marron	T/C
M4 Sakura	Mâle	Sakura/Beaugosse	Marron	T/C
M 5 Sakura	Mâle	Sakura/Beaugosse	Marron	C/C
F 1 Sakura	Femelle	Sakura/Beaugosse	Marron	C/C
Loutre	Femelle		Marron	C/C
M 1 Loutre	Mâle	Loutre/Balou	Marron	C/C
M 2 Loutre	Mâle	Loutre/Balou	Marron	T/C
M 3 Loutre	Mâle	Loutre/Balou	Marron	T/C
M 4 Loutre	Mâle	Loutre/Balou	Marron	Echec
M 5 Loutre	Mâle	Loutre/Balou	Marron	T/C
M 6 Loutre	Mâle	Loutre/Balou	Marron	C/C
F 1 Loutre	Femelle	Loutre/Balou	Marron	T/C
F2 Loutre	Femelle	Loutre/Balou	Marron	Echec
Brioche	Femelle		Marron	T/C
F1 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	Echec
F2 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	C/C
F3 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/C
F4 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/T
F5 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/T
F6 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/T
M1 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/T
M2 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	Echec
M3 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/C

M4 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/C
M5 brioche	Femelle	Brioche/Dumbo	Marron	T/C
M1 sakura	Mâle	Sakura/Dumbo	Marron	T/C
M2 sakura	Mâle	Sakura/Dumbo	Marron	T/C
M3 sakura	Mâle	Sakura/Dumbo	Marron	T/C
F1 sakura	Femelle	Sakura/Dumbo	Marron	C/C
F2 sakura	Femelle	Sakura/Dumbo	Marron	Echec
Atchoum	Mâle		Bleu	T/T
Barbie	Femelle		Vairon	C/C
F1 TB	Femelle	Turquoise/Beaugosse	Marron	Echec
F2 TB	Femelle	Turquoise/Beaugosse	Marron	T/C
M1 TB	Mâle	Turquoise/Beaugosse	Marron	T/T
M2 TB	Mâle	Turquoise/Beaugosse	Vairon	T/C
M3 TB	Mâle	Turquoise/Beaugosse	Bleu	Echec
M4 TB	Mâle	Turquoise/Beaugosse	Vairon	T/C
F1 Zaza	Femelle	Zaza/Dumbo	Marron	C/C
F2 Zaza	Femelle	Zaza/Dumbo	Marron	Echec
F2 Zaza	Femelle	Zaza/Dumbo	Marron	T/C
M2 Zaza	Mâle	Zaza/Dumbo	Marron	T/C
M3 Zaza	Mâle	Zaza/Dumbo	Marron	T/C
H2E0725	Femelle		Vairon	Echec
H2F1072	Mâle		Vairon	Echec
H2F1068	Mâle		Vairon	C/C
Kimi	Femelle		Marron	T/C
Prunille	Femelle		Marron	C/C



Chien ayant au moins un œil bleu.

Nous avons calculé les fréquences des trois génotypes (*Tableau 18*).

*Tableau 18 : Effectifs et pourcentages des différents génotypes obtenus en fonction de la couleur des yeux chez les beagles*

	T/T	T/C	C/C
Chien aux yeux marron	6 (15%)	22 (57%)	11 (28%)
Chien avec au moins un œil bleu	1 (11%)	6 (67%)	2 (22%)

Nous avons testé statistiquement si ces trois distributions étaient différentes (*Tableau 19*).

*Tableau 19 : Effectifs attendus si la répartition des allèles était indépendante de la couleur des yeux*

	T/T	T/C	C/C
Chien aux yeux marron	5,59	22,75	10,56
Chien avec au moins un œil bleu	1,31	5,25	2,44

Les effectifs obtenus et les effectifs attendus étaient très proches. Un test du  $\chi^2$  a été réalisé même si deux des effectifs attendus étaient inférieur à 5. (2) Les effectifs des génotypes observés entre les chiens aux yeux marron et ceux ayant au moins un œil bleu n'étaient pas significativement différents ( $p > 0,05$ ). Il n'y avait donc pas d'association entre la couleur des yeux et le génotype pour le SNP de l'intron 85 de *HERC2* chez nos beagles.

## **IV. Discussion**

### **IV.1. Étude ophtalmologique**

Les chiens avec un iris de couleur bleue présentaient un fond d'œil dépigmenté et ne possédaient pas de zone du tapis. La zone sans tapis pigmentée claire pourrait correspondre à une pigmentation modérée de la choroïde et non de l'épithélium, mais pour le déterminer il serait nécessaire de réaliser une analyse histologique. Celle-ci n'a pu être réalisée car un chien aurait dû être sacrifié. Dans l'étude de Shibuya et collaborateurs (50), une analyse histologique a été réalisée sur un beagle avec un iris de couleur bleue et un fond d'œil de type subalbinos (ressemblant au fond d'œil des chiens aux iris bleus de notre étude). Cette analyse a montré que l'épithélium pigmentaire de la rétine, de l'iris et du corps ciliaire avaient une pigmentation normale et que la choroïde, la partie antérieure de l'iris et le stroma du corps ciliaires avaient une concentration en mélanine diminuée. La choroïde, la partie antérieure de l'iris et le stroma du corps ciliaires dérivent du mésoderme et leurs mélanocytes proviennent de la crête neurale alors que l'épithélium pigmentaire de la rétine, de l'iris et du corps ciliaires dérivent de la neuroectoderme. Il est donc possible que le défaut de production de mélanine dans les mélanocytes oculaires se développe uniquement dans les tissus issus du mésoderme. (50) Ces résultats histologiques d'œil subalbinos ont été retrouvés dans un certain nombre de chiens aux yeux bleus toutes races confondues. (39) On peut donc faire l'hypothèse que les beagles subalbinos de notre étude avaient une pigmentation de l'œil similaire à ces chiens.

Burns et collaborateurs (9) ont étudié des beagles de laboratoire présentant un iris peu pigmenté. Chez ces chiens, le défaut de pigmentation se trouvait dans l'épithélium pigmentaire de la rétine, de l'iris et de la choroïde contrairement à ce qui avait été observé chez le beagle subalbinos. De plus, le stroma de l'iris et la choroïde présentaient des mélanosomes normaux mais en nombre diminué. Par ailleurs ces beagles avaient une dégénérescence du tapis à partir de 21 jours après la naissance. De plus, les autres structures de l'œil ne présentaient aucune anomalie ainsi que les examens oculaires. La vision et les ERG étaient normaux bien que la vision nocturne n'ait pas été étudiée. Les fonds d'œil de ces chiens étaient rouges légèrement bruns sans tapis, ressemblant fortement au fond d'œil de certains beagles de notre étude dont l'iris était de couleur bleue. Certains de ces beagles avec une dégénérescence du tapis présentaient un pelage avec des poils argentés ce qui n'a été pas retrouvé chez nos beagles subalbinos sauf pour H0G3700 qui a grisonné autour des yeux avec l'âge. De plus, la dégénérescence héréditaire du tapis chez le beagle a été décrite comme autosomique récessive. Or chez nos beagles la transmission semblait plus complexe (8). On peut donc supposer que les beagles de notre étude ne présentaient pas le tableau clinique décrit par Burns et collaborateur (9) et que la dégénérescence héréditaire du tapis n'était donc pas associée à la couleur de leurs yeux.

La plupart des beagles ayant un iris bleu n'ont pas de tapis. Le tapis sert à réfléchir la lumière afin de stimuler plusieurs fois les photorécepteurs. Il permet donc d'avoir une meilleure vision lors d'intensité lumineuse faible. Il est donc possible d'envisager qu'un œil bleu sans tapis diminue la vision nocturne. Pour l'examen électrorétinographique (ERG), certains chiens (Barbie, Néo, Wiki, les chiots de Turquoise) ayant au moins un iris bleu n'ont pas eu d'ERG car ces derniers étaient partis à l'adoption très jeune. De plus, une étude comparative des résultats des ERG en fonction du sexe n'a pas pu être réalisée car notre étude comportait plus de mâles que de femelles. Les résultats des ERG ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre l'œil avec un iris de couleur marron et l'œil avec un iris de couleur bleue ayant un fond d'œil subalbinos et sans tapis. Pour l'œil hétéochromique bleu qui avait un fond d'œil avec des plages dépigmentées et avec tapis, les valeurs (amplitude et temps de culminations des ondes a et b dans les différentes ambiances étudiées) étaient proches des moyennes du lot témoin. Cependant, dans l'étude, un seul chien présentait ce type d'yeux. Il n'y avait donc pas assez de valeurs d'ERG pour conclure. De même, les ERG avaient des résultats identiques pour un œil avec un iris marron et un fond d'œil d'aspect classique et un œil avec un iris bleu ayant un fond d'œil subalbinos et sans tapis.

Dans l'étude de Roselen et collaborateurs (45) , des chiens de race beagle (ainsi que d'autres races) présentaient une onde négative post-onde b. Chez les chiens ne présentant pas de tapis, cette onde négative post-onde b était absente. Les valeurs d'amplitude et du temps de culmination des ondes a et b étaient identiques, que le chien ait un tapis ou non. Dans notre étude, il n'y avait pas d'onde négative post-onde b observée, contrairement à l'étude de Roselen et collaborateurs (45) . Cette différence peut être dû à une technique d'enregistrement ou à l'utilisation d'appareils différents. De plus dans l'étude de Roselen et collaborateurs, à la différence des beagles subalbinos, l'absence de tapis était consécutive à sa dégénérescence précoce.

En conclusion, les beagles que nous avons étudiés et ayant un iris de couleur bleue avaient un fond d'œil de type subalbinos (dépigmenté sans tapis). La couleur des iris n'avait pas de conséquences sur les valeurs obtenues lors des ERG ainsi que sur la fonction visuelle dans les limites de son évaluation chez le chien. Seul les fonds d'œil différaient.

## IV.2. Étude génétique

Les chiens beagles de l'étude, présentant au moins un œil de couleur bleue, avaient un pelage coloré autour de l'œil à l'exception des deux beagles provenant de l'élevage américain. Ces derniers avaient une tête entièrement blanche. La présence d'un pelage coloré autour des yeux de couleur bleue nous a orienté vers un défaut de pigmentation d'origine oculaire n'ayant aucun rapport avec la couleur du pelage. En effet, chez certains animaux, la couleur des yeux est corrélée à la couleur du pelage. C'est par exemple le cas des chiens de pelage merle qui ont plus fréquemment des iris hétéochromiques ou de couleur bleue. Ce phénotype est plus marqué chez les chiens homozygotes merle. (26) Par ailleurs, la couleur bleue de l'iris est aussi corrélée au pelage blanc du chat ou du cheval. Pour les deux beagles ayant une tête entièrement blanche, la

présence d'un œil bleu peut être une coïncidence : les beagles américains ont peut-être plus souvent la tête blanche que les beagles européens. L'étude d'un plus grand nombre de chiens est nécessaire pour analyser le lien entre panachure et couleur des yeux chez les beagles américains.

Les croisements et l'arbre généalogique des chiens provenant de l'élevage de Harlan ont montré des liens de parenté entre les chiens ayant au moins un œil bleu. La transmission de la couleur des yeux chez le beagle semble donc génétique. Les 4 mâles 8001, 3515630, 3529410 et 2CE7 étaient fortement suspectés d'avoir une des mutations en cause de cette couleur de l'iris. On a remarqué que les parents des chiens ayant au moins un œil bleu avaient comme ascendant au moins un de ces 4 mâles, exceptés Saphir, H2E0725, H2F1068 et H2F1072 qui avaient au moins un parent qui ne descendait pas de ces 4 mâles. Ces quatre chiens avaient cependant le même père (H5I2456) qui n'avait pas de lien de parenté avec les 4 mâles suspects. Pour le chien Saphir, ses parents ne descendaient d'aucun des ces 4 mâles. Mais l'arbre généalogique de Saphir était incomplet, il ne remontait que jusqu'à ses grands parents dans la branche maternelle. On peut donc se demander si, dans cet élevage, il n'y avait pas plusieurs chiens porteurs des yeux bleus. Ainsi, les chiens 8001, 3515630, 3529410, 2CE7, H5I2456 pouvaient être fortement suspects de porter une des mutations responsables de la couleur bleue de l'iris.

L'analyse des pourcentages de chiots aux yeux bleus et marron et issus d'un croisement entre un chien aux yeux bleus et un chien aux yeux marron demande à être complétée. En effet, nous n'avons obtenu que deux portées de ce type. Par manque de temps et en raison du faible nombre de femelles ayant au moins un œil bleu et pouvant se reproduire, il n'a pas été possible d'avoir plus de portées. En revanche, le nombre de croisements entre un chien aux yeux marron et un chien ayant au moins un œil bleu était conséquent. De plus, le fait qu'aucun chiot ait eu au moins un œil bleu dans ces croisements permet d'imaginer que les deux parents doivent être porteurs d'un facteur génétique yeux bleus pour avoir des chiots aux yeux bleus. Cette hypothèse reste cependant en contradiction avec les résultats des accouplements effectués dans les élevages Harlan et américains où les chiots aux yeux bleus sont toujours nés de parents aux yeux marron, les animaux aux yeux bleus étant systématiquement retirés des programmes de reproduction.

L'analyse des croisements et de l'arbre généalogique a permis d'écartier certains types de transmission et les deux possibilités restantes étaient la transmission polygénique ou la transmission dominante à pénétrance fortement réduite. La transmission polygénique nous semble plus probable étant donné le faible nombre de chiens aux yeux bleus obtenu lors des croisements et du fait que chez l'homme la transmission de la couleur des yeux est un caractère polygénique.

Un test  $\chi^2$  pour la répartition des génotypes du SNP T/C entre les chiens aux yeux marron et ceux ayant au moins un œil bleu a été réalisé même si deux des effectifs attendus étaient inférieurs à 3. En effet, le test adéquat en cas d'effectifs théoriques <5 reste le  $\chi^2$  mais avec une correction de Yates et s'il y a des effectifs théoriques <3 il est nécessaire d'utiliser un test exact de Fisher qui est très difficile à effectuer en pratique. Le  $\chi^2$  reste malgré tout utilisable d'après Bouyer. (2)

Le test du  $\chi^2$  a montré que les génotypes pour le SNP n'étaient pas significativement différents en fonction de la couleur de l'iris. Ainsi le SNP trouvé dans l'intron 85 du gène *HERC2* n'était pas associé à la couleur de l'iris chez nos beagles. L'analyse des résultats du séquençage et du génotypage n'a pas permis de mettre en évidence un polymorphisme associée à la couleur des yeux dans l'intron 85 au niveau de la région conservée entre l'homme et le chien. Les résultats obtenus n'ont donc pas pu démontrer que la séquence de l'intron 85 chez le chien avait un impact sur la couleur des yeux. Les SNP situés dans les gènes *OAC2* et *HERC2* identifiés chez l'homme et associés à la couleur des yeux n'ont pas été retrouvés chez le beagle. Des mutations pourraient cependant se retrouver dans ces deux gènes mais comme ils sont très grands (le gène *HERC2* possède 94 exons et le gène *OAC2* a 22 exons), il serait coûteux de chercher une mutation dans ces gènes par séquençage. Nous aurions pu faire une recherche des régions génomiques associées à la couleur des yeux par la méthode du clonage positionnel mais par manque de temps et d'argent ceci n'a pas pu être fait. Nous aurions pu également rechercher des mutations dans d'autres gènes comme *SLC2A4*, *TYR*, *TYRP1*, *SCL45A2*, *IRF4*, *LYST* mais ils sont peu déterminants dans la couleur des yeux chez l'homme.

Il serait donc possible que la détermination de la couleur des yeux chez le chien et chez l'homme soit très différente car chez le chien, il existe beaucoup de chiens aux yeux vairons alors que chez l'homme le caractère vairon est plutôt rare. De plus, le fond d'œil d'un chien aux yeux bleus est subalbinos alors que chez l'homme ce n'est pas le cas.

# CONCLUSION

Notre travail sur la couleur des yeux chez le beagle avait pour but d'identifier le potentiel caractère héréditaire, l'éventuel mode de transmission et de rechercher la ou les mutations responsables de la couleur de l'iris chez des chiens beagle issus de pedigrees expérimentaux. Nous souhaitions également caractériser le phénotype « yeux bleus ». Pour cela, nous avons accueilli à l'ENVA des chiens beagle aux yeux bleus provenant de plusieurs élevages expérimentaux situés en Europe et aux Etats-Unis (Harlan France, Marshall Italie, Marshall USA). En effet, ces chiens dont la couleur bleue des yeux n'est pas désirée, sont écartés des programmes de reproduction. Nous avons donc pu facilement accueillir ces chiens sur le site de l'ENVA. De plus, nous avons réalisé des accouplements entre chiens aux yeux bleus et aux yeux marron, afin d'agrandir notre cohorte.

Lors de notre étude ophtalmologique, nous avons noté que les beagles aux yeux bleus étudiés présentaient en réalité trois phénotypes différents : soit une hétérochromie de l'iris, soit des yeux vairons (un œil bleu et un œil marron), soit les deux yeux bleus. Les yeux ayant un iris de couleur bleue présentaient un fond d'œil peu pigmenté (majoritairement rouge) avec une absence de tapis. Les yeux avec une hétérochromie de l'iris présentaient un fond d'œil avec tapis qui comprenait plus ou moins de plages dépigmentées. Les yeux ayant un iris de couleur marron présentaient un fond d'œil pigmenté avec un tapis.

Une analyse statistique des résultats obtenus à partir des courbes ERG réalisées sur ces beagles a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les yeux de couleur bleue ou de couleur marron. Ainsi, malgré les différences observées sur le fond d'œil, la fonctionnalité de l'œil semblait identique, que l'iris soit de couleur bleue ou marron. Cependant, cette analyse ne nous a pas permis de conclure pour les yeux ayant un iris hétérochromatique du fait du trop faible nombre de chiens dans cette situation.

L'arbre généalogique réalisé à partir des données de pedigree des chiens importés, ainsi que les croisements réalisés à l'ENVA, nous ont permis de déterminer que la couleur des yeux bleus chez le beagle était héréditaire et très probablement polygénique (mode de transmission complexe, nombreux gènes en cause).

De plus, la liste des gènes et régions candidats pour la couleur des yeux chez le beagle a été dressée en étudiant les gènes responsables du phénotype homologue chez l'homme. Les gènes *OAC2* (*oculocutaneous albinism type 2*), et *HERC2* (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*) qui contrôle l'expression du gène *OAC2*, seraient responsables de la transmission de la couleur bleue ou brune de l'iris chez l'homme. Chez l'homme, il a été identifié des variations dans les régions géniques pouvant contenir la/les mutation(s) responsable(s) de ce caractère : trois SNP dans l'intron 1 du gène *OAC2* ; un SNP dans l'intron 4, un SNP dans l'intron 12, un SNP dans l'intron 86 et un SNP dans le 3'UTR du gène *HERC2*. De plus, d'autres gènes comme *SLC2A4* (*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4*), *TYR* (*tyrosinase*), *TYRP1* (*tyrosinase related protein 1*), *SCL45A2* (*solute carrier family 45, member 2*) et *IRF4* (*interferon regulatory factor 4*) pourraient contribuer à la nuance de couleur de l'iris.

Les gènes *OAC2/ HERC2* étant très longs, seules les régions impliquées chez l'homme et donc potentiellement impliquées chez nos chiens ont été étudiées. Ces régions étaient l'intron 1 du gène *OAC2*, et les introns 4, 12 et 86 ainsi que le 3'UTR du gène *HERC2*. La comparaison génomique de ces régions entre l'homme et le chien nous a permis d'identifier une région très conservée entre ces deux espèces : l'intron 85 du chien correspondant à l'intron 86 de l'homme pour le gène *HERC2*. Le séquençage de cette région chez différents beagles de l'étude a permis d'identifier un SNP T/C. Toutefois, l'analyse statistique a montré que ce SNP ne présentait pas d'association avec le phénotype « yeux bleus ». Ainsi, les mutations en cause pour la couleur des yeux chez le beagle restent inconnues à ce jour. Afin d'identifier les mutations responsables de ce caractère, il serait nécessaire de faire une recherche des régions génomiques associées/liées à la couleur des yeux par la méthode du clonage positionnel, ce qui n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette thèse faute de financement et de temps.

En conclusion, nous avons montré que, même si les chiens aux yeux bleus présentaient un fond d'œil subalbinos, la fonctionnalité de l'œil n'était pas impactée par sa couleur. Cette étude a de plus permis de conclure que la couleur bleue de l'œil était transmissible génétiquement et que le mode de transmission était très probablement polygénique.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALHAIDARI Z., OLIVRY T., ORTONNE J-P. Melanocytogenesis and melanogenesis : genetic regulation and comparative clinical diseases. *Veterinary Dermatology*, 1999, 3-16
- (2) BOUYER J. Méthodes statistiques Médecine Biologie. *INSERM*, 1996, 351 p.
- (3) BOYKO AR. The domestic dog: man's best friend in the genomic era. *Genome Biol.* 2011, **12**(2), 216.
- (4) BREEN M. Canine cytogenetics-from band to basepair. *Cytogenet Genome Res.* 2008; **120**(1-2):50-60.
- (5) BREEN M., HITTE C., LORENTZEN T.D., THOMAS R., CADIEU E., SABACAN L., et al. An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. *BMC Genomics*. 2004 Sep 13; **5**:65.
- (6) BREEN M., JOUQUAND S., RENIER C., MELLERSH C.S., HITTE C., HOLMES NG., et al. Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Res.* 2001 Oct; **11**(10):1784-95.
- (7) BREEN M., THOMAS R., BINNS M.M., CARTER N.P., LANGFORD C.F. Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotypes of the domestic dog (*Canis familiaris*) and human. *Genomics*. 1999 Oct 15; **61**(2):145-55.
- (8) BURNS M.S., BELLHORN R.W., IMPELLIZZERI C.W., AGUIRRE G.D. et LATIES A.M. Development of hereditary tapetal degeneration in the beagle dog. *Curr Eye Res.* 1988 Feb; **7**(2):103-14.
- (9) BURNS M.S., BELLHORN R.W., IMPELLIZZERI C.W., AGUIRRE G.D. et LATIES A.M. Melanosome abnormalities of ocular pigmented epithelial cells in beagle dogs with hereditary tapetal degeneration. *Curr Eye Res.* 1988 Feb; **7**(2):115-23.
- (10) CHAUDIEU G., CHAHORY S. Affections oculaires héréditaires ou à prédisposition raciale chez le chien, 2<sup>ème</sup> édition, *Point vétérinaire*, 2013, 307-311.
- (11) CHANTRY-DARMON C. Construction d'une carte intégrée génétique et cytogénétique chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) : application à la primo localisation du caractère rex, *Thèse Docteur en Sciences, université de Versailles-Saint-Quentin*, 2005, 219p.
- (12) CLERC B. Rétine, fond d'œil et nerf optique. In : Ophtalmologie vétérinaire. 2nd ed. *Edition du Point Vétérinaire*, 1997, 419-455.

- (13) CORPET F., *Multiple sequence alignement (Multalin)*, Mise à jour le 28/03/2000, [<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>], (consulté en juillet 2012).
- (14) DERRIEN T. L'analyse comparée des génomes : applications à l'identification de nouveaux gènes canins. *Thèse de doctorat de biologie, l'université de Rennes, Rennes*, 2012, n°3627, 137 p.
- (15) DONNELLY M.P., PASCHOU P., GRIGORENKO E., GURWITZ D., BARTA C., LU R.B., et al. A global view of the OCA2-HERC2 region and pigmentation. *Hum Gene*, 2012, **131**(5), 683-696
- (16) DUFFY D.L., MONTGOMERY G.W., CHEN W., ZHAO Z.Z., LE L., JAMES M.R., et al. A three single nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of oca2 explains most human eye-color variation. *Am J Hum Genet*, 2007, **80**(2), 241-252
- (17) DURAIRAJ C., CHASTAIN JE., KOMPELLA UB. Intraocular distribution of melanin in human, monkey, rabbit, minipig and dog eyes. *Exp Eye Res*, May 2012, **98**, 23-27
- (18) EGGEN A. Cartographie fine d'un gène et clonage positionnel. *INRA Prod. Anim.*, 2000, numéro hors-série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 133-136.
- (19) EMBL-EBI, Welcome Trust Sanger Institute. *Ensembl*, [en-ligne], Mise à jour en juillet 2012 [<http://www.ensembl.org>], (consulté en juillet 2012).
- (20) FEINGOLD J., FELLOUS M., SOLIGNAC M., Principes de génétique humaine, *Hermann Paris*, 1998, 586p.
- (21) GELATT K. Essentials of veterinary ophthalmology, 2<sup>ème</sup> edition, *Blackwell Publishing*, 2008, 640p.
- (22) GRANDJEAN D., VAISSAIRE JP., et al. Encyclopédie du chien Royal canin, *Aniwa Publishing*, 2006, 200
- (23) GRIFFITHS A., GELBART W., MILLER J., LEWONTIN C., Analyse Génétique Moderne, 1<sup>ère</sup> édition, *DeBoeck Université*, 2001, 696p.
- (24) GRIFFITHS A., MILLER J., SUZUKI D., LEWONTIN C., GELBART W. Introduction à l'analyse génétique, 3<sup>ème</sup> édition, *DeBoeck Université*, 2002, 848p.
- (25) GUYON R., LORENTZEN T.D., HITTE C., KIM L., CADIEU E., PARKER H.G., et al. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr, **29**;100(9), 5296-301.
- (26) HEDAN B., CORRE S., HITTE C., DREANO S., VILBOUX T., DERRIEN T. et al. Coat colour in dogs: identification of the merle locus in the Australian shepherd breed. *BMC Vet Res*. 2006 Feb, **27**;2:9.
- (27) KAPLAN J.C., DELPECH M. Biologie Moléculaire et Médecine, 2<sup>ème</sup> édition, *Médecine-Sciences Flammarion*, 1998, 790p.

- (28) KARLSSON E.K., LINDBLAD-TOH K. Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. *Nat Rev Genet.* 2008 Sep;9(9):713-25.
- (29) LELIEVRE D.U., BROEUILLE A. Contribution à la mise au point d'une électrode DTL pour le recueil de l'électrorétinogramme chez le chien. *Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Alfort*, 2002, 83 p.
- (30) LEQUARRÉ A.S., ANDERSSON L., ANDRÉ C., FREDHOLM M., HITTE C., LEEB T., et al. A European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *Vet J.* 2011 Aug, **189**(2), 155-9.
- (31) LIGNEREUX Y. Éléments d'anatomie ophtalmologique du chien - *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1997. **32 : supplément 4**, 7-20.
- (32) LINDBLAD-TOH K., WADE C.M., MIKKELSEN T.S., KARLSSON E.K., JAFFE D.B., KAMAL M., et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 2005 Dec 8, **438**(7069), 803-19.
- (33) LIU F., WOLLSTEIN A., HYSI P.G., ANKRA-BADU G.A., SPECTOR T.D., PARK D., et al. Digital quantification of human eye color highlights genetic association of three new loci. *PLoS Genet*, 2010, **6**(5), e1000934
- (34) MÂLE R. Comparaison des effets cardiovasculaires et respiratoires et des impacts sur les électrorétinogrammes de trois protocoles anesthésiques chez le chien. *Thèse de doctorat vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, Toulouse*, 2010, 80 p.
- (35) MELLERSH C.S., HITTE C., RICHMAN M., VIGNAUX F., PRIAT C., JOUQUAND S., et al. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mamm Genome*. 2000 Feb; **11**(2):120-30.
- (36) MENGEL-FROM J., BORSTING C., SANCHEZ J.J., EIBERG H., MORLING N. Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, **4**(5), 323-328
- (37) NARFSTRÖM K., EKESTEN B., ROSOLEN SG, SPIESS BM, PERCICOT CL, OFRI R. Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Documenta Ophthalmologica*, 2002, **105**, 83-92
- (38) NEFF M.W., BROMAN K.W., MELLERSH C.S., RAY K., ACLAND G.M., et al. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics*. 1999, **151**:803-820.
- (39) NEWKIRK K.M., HAINES D.K., CALVARESE S.T., ESSON D.W., CHANDLER H.L. Distribution and amount of pigment within the ciliary body and iris of dogs with blue and brown irides. *Vet Ophthalmol*. 2010, **13** (2), 76-80
- (40) National Center For Biotechnology Information (NCBI). *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, [en-ligne], Mise à jour le 09/03/2012 [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>], (consulté en juillet 2012).

- (41) OLLIVIER F., SAMUELSON D., BROOKS D., LEWIS P., KALLBERG M., KOMAROMY A. Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Vet Ophthalmol.* 2004;7(1):11-22.
- (42) PARKER H.G., SHEARIN A.L., OSTRANDER E.A. Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyse in the domestic dog. *Annu Rev Gene*, 2010, **44**, 309-336.
- (43) PRIAT C., HITTE C., VIGNAUX F., RENIER C., JIANG Z., JOUQUAND S., et al. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics*. 1998 Dec 15;54(3):361-78.
- (44) PROTA G., HU DN., VINCENSI M., Mc CORMICK SA., NAPOLITANO A. Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Exp Eye Res*, 1998, **67**(3), 293-299
- (45) ROSOLEN S.G, CHARLIER C., RIGAUDIERE F., LACHAPELLE P. The ERG of Beagle dog: evidence associating a post b-wave negativity with the *Tapetum Lucidum*. *Doc Ophthalmol*. 2005 Mars-Mai ;110(2-3):145-53.
- (46) SARGAN D.R., YANG F., SQUIRE M., MILNE B.S., O'BRIEN P.C., FERGUSON-SMITH M.A. Use of flow-sorted canine chromosomes in the assignment of canine linkage, radiation hybrid, and syntenic groups to chromosomes: refinement and verification of the comparative chromosome map for dog and human. *Genomics*. 2000 Oct 15;69(2):182-95.
- (47) SALMUELSON D.A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT KN. *Veterinary ophthalmology. Volume1*. Fourth edition Blackwell publishing, Ames, 2007, 37-148
- (48) SAURET J. Embryologie et anatomie de l'œil et de ses organes accessoires. *Encyclopédie vétérinaire, Paris, ophthalmologie*, 4 (0100), 1994, 1-17
- (49) SHEARIN A.L., OSTRANDER E.A. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis Model Mech*. 2010 Jan-Feb, **3**(1-2), 27-34.
- (50) SHIBUYA K., HIRAI T., NUNOYA T., SUGIMOTO K. Unilateral ocular subalbinism in a laboratory Beagle dog. *Vet Ophthalmol*. 2003, **6** (2), 169-172
- (51) SPICHENOK O., BUDIMLIJA Z.M., MITCHELL A.A., JENNY A., KOVACEVIC L., MARJANOVIC D., et al. Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, **5**(5), 472-478
- (52) STURM R.A., DUFFY D.L., ZHAO Z.Z., LEITE F.P., STARK M.S., HAYWARD N.K., et al. A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color. *Am J Hum Genet*, 2008, **82**(2), 424-431
- (53) SWITONSKI M., SZCZERBAL I., NOWACKA J. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. *J Appl Genet*. 2004, **45**(2), 195-214.

- (54) TURNER S., BOUHANNA L. Guide pratique d'ophtalmologie vétérinaire, *1<sup>ère</sup> édition, med'com*, 2010, 370p.
- (55) VIALLET-LEBORGNE-GODENER C. Recherche du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Leonberg. *Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Alfort*, 2010, 156 p.
- (56) WAYNE R.K., OSTRANDER E.A. Lessons learned from the dog genome. *Trends Genet.* 2007 Nov, **23**(11), 557-67.
- (57) XILLO G. Apport de la biologie moléculaire au dépistage des affections héréditaires de la rétine en espèce canine. *Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon*, 2003, n°102
- (58) YANG F., GRAPHODATSKY A.S., O'BRIEN P.C., COLABELLA A., SOLANKY N., SQUIRE M., et al. Reciprocal chromosome painting illuminates the history of genome evolution of the domestic cat, dog and human. *Chromosome Res.* 2000; **8**(5):393-404.
- (59) YANG F., O'BRIEN P.C., MILNE B.S., GRAPHODATSKY A.S., SOLANKY N., TRIFONOV V., et al. A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*. 1999 Dec 1; **62**(2):189-202.



# Annexe 1 : Protocole de l'automate Maxwell à partir du sang



## 3. Before You Begin

### Maxwell® 16 Instrument Hardware and Firmware Setup

To use the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit or Buccal Swab LEV DNA Purification Kit, the Maxwell® 16 Instrument must be configured with LEV hardware. If your Maxwell® 16 Instrument contains standard elution volume (SEV) hardware, it will need to be reconfigured using the Maxwell® 16 LEV Hardware Kit (Cat.# AS1250). Reconfiguring the instrument is simple and easy. Refer to the *Maxwell® 16 Instrument Technical Manual* specific for your instrument for directions.

### Materials to Be Supplied by the User

- optional, rotating tube mixer for liquid blood samples
- benchtop vortex mixer
- pipetters and pipette tips for sample transfer into pre-filled reagent cartridges
- 1.5–2.0ml tubes for incubation of samples (e.g., Microtubes, 1.5ml [Cat.# V1231])
- heating block set at 56°C
- microcentrifuge (buccal swab protocol)
- buccal swabs (e.g., Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PD or 25-806 1PC)

### 3.A. Preparation of Whole Blood Samples (Cat.# AS1290)

#### Whole Blood Sample Processing Capacity

The total yield of genomic DNA from whole blood samples depends on the sample volume and number of white blood cells/ml. Each cartridge supplied in the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Purification Kit is designed to purify genomic DNA from up to 300µl of whole blood, assuming an average number of white blood cells in the range of  $4 \times 10^6$  to  $1.1 \times 10^7$ /ml whole blood (values for a normal healthy adult: 1).

Note: Whole blood samples collected in EDTA, ACD or heparin tubes can be used. These samples may be either fresh or frozen. Frozen samples should be thawed before processing. We recommend mixing all blood samples before use. EDTA blood collection tubes are preferred if the purified DNA will be used in downstream amplification assays.

1. Mix all blood samples for at least 5 minutes at room temperature.
2. Prepare and label incubation tubes compatible with heating block.
3. Add 30µl of Proteinase K (PK) Solution to each incubation tube.
4. Add liquid blood (up to 300µl) to each incubation tube.
5. Add 300µl of Lysis Buffer to each incubation tube.
6. Vortex each tube for 10 seconds.
7. Incubate each tube in the heating block (set to 56°C) for 20 minutes. During this incubation, prepare cartridges as described in Section 3.C.
8. Transfer each blood lysate sample from the incubation tube to well #1 of each cartridge. (Well #1 is the well closest to the cartridge label and furthest from the user.)

## Annexe 2 : Protocole de l'automate Maxwell à partir de brossettes buccales



### 3.B. Preparation of Buccal Swab Samples (Cat.# AS1295)

#### Buccal Swab Sample Processing Capacity

The total yield of genomic DNA from buccal swab samples depends on the cellular material contained on the swabs. Each cartridge supplied in the Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit is designed to purify genomic DNA from 1 or 2 buccal swabs.

Note: Customers have performed this protocol successfully with samples collected using Pur-Wraps Sterile Polyester Tipped Applicators, Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1FD or Pur-Wraps Sterile Cotton Tipped Applicators, Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PC. We also recommend using Promega Microtubes, 1.5ml (Cat.# V1231) for sample preparation.

1. Collect samples with a standard buccal swab collection procedure.
2. Assemble a Clearing Column/microtube for each sample.
3. Cut the head off the applicator stick. Add dried swab head to the Clearing Column/microtube assembly.
4. In a separate tube, mix 300µl Lysis Buffer + 30µl Proteinase K for each sample.
5. Add 330µl of Lysis Buffer/Proteinase K to swab head in the Clearing Column/microtube assembly.
6. Close tube over the Clearing Column and vortex for 10 seconds.  
Note: If using tubes other than the recommended Cat.# V1231, the tube may not close.
7. Incubate for 20 minutes at 56°C.  
Note: Some flowthrough from the column may be observed in the microtube after incubation. This is normal.
8. Centrifuge the Clearing Column/microtube assembly with swab for 2 minutes at maximum speed.
9. Remove the Clearing Column with swab head and discard.
10. Add flowthrough to well #1 of the Maxwell® 16 LEV cartridge (see section 3.C for cartridge preparation).
11. Process using Maxwell® 16 in LEV Research Mode using the LEV Blood method (see Section 4).
12. Once the extraction is complete, remove and cap each elution tube. Store appropriately until use.



## Annexe 3 : Suite du protocole de l'automate Maxwell



### 3.C. Maxwell® 16 Cartridge Preparation

1. Change gloves before handling cartridges, LEV Plungers and Elution Tubes. Place the cartridges to be used in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack (Cat.# AS1251). Place each cartridge in the rack with the label side facing away from the Elution Tubes. Press down on the cartridge to snap it into position. Carefully peel back the seal so that all plastic comes off the top of the cartridge. Ensure that all sealing tape and any residual adhesive are removed before placing cartridges in the instrument.
2. Place one plunger into well #8 of each cartridge.
3. Place an empty Elution Tube into the Elution Tube position for each cartridge in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack. Add 50µl of Elution Buffer to the bottom of each Elution Tube.

#### Notes:

1. If you are processing fewer than 16 samples, center the cartridges on the platform.
2. Specimen or reagent spills on any part of the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack should be cleaned with a detergent-water solution, followed by a bacteriocidal spray or wipe, then water. Do not use bleach on any instrument parts.

Well Contents	User Adds:
1. Binding Buffer	Sample
2. Paramagnetic Colloidal Particles	
3. Wash Buffer	
4. Wash Buffer	
5. Wash	
6. Wash	
7. Water	
8. Empty	Plunger



Figure 1. Maxwell® 16 LEV DNA Purification Cartridge. This figure shows the contents of a cartridge. In all cases, lysate sample is added to well #1.



Figure 2. Setup and configuration in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack. Elution Buffer is added to the Elution Tubes as indicated.

#### 4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments

##### Setup for AS2000 Maxwell® 16 Instruments

Refer to the *Maxwell® 16 Instrument Operating Manual* #TM295 for more detailed information.

To run the "Blood" protocol, you must have Maxwell® 16 firmware version 4.71 or higher installed on your instrument.

1. Turn on the Maxwell® 16 Instrument. The instrument will power up, display the firmware version number, proceed through a self-check and home all moving parts.
2. Verify that the instrument settings indicate an "LEV" hardware configuration and "Rsch" operational mode setting.
3. Select "Run" on the Menu screen, and press the Run/Stop button to start the method.
4. Select "DNA" on the menu screen, then select "OK" at the Verification screen.
5. Select "Blood" on the Menu screen, then select "OK" at the Verification screen. "Blood" Method is used for both kits (Cat# AS1290 and AS1295).
6. Open the door when prompted to do so on the screen. Press the Run/Stop button to extend the platform.



Warning: Pinch point hazard.

7. Transfer the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack containing the prepared cartridges on the Maxwell® 16 Instrument platform. Ensure that the rack is placed in the Maxwell® 16 Instrument with the Elution Tubes closest to the door. The rack will only fit in the instrument in this orientation. If you have difficulty fitting the rack on the platform, check that the rack is in the correct orientation. Ensure that the cartridge rack is level on the instrument platform.

Note: Hold the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack by the sides to avoid dislodging cartridges from the rack.

8. Verify that samples were added to well #1 of the cartridges, cartridges are loaded on the instrument, Elution Tubes are present with 50µl of Elution Buffer and LEV Plungers are in well #8.
9. Press the Run/Stop button. The platform will retract. Close the door.



Warning: Pinch point hazard.

- 
10. The Maxwell® 16 Instrument will immediately begin the purification run. The screen will display the steps performed and the approximate time remaining in the run.

Notes:

1. Pressing the Run/Stop button or opening the door will pause the run.
2. If the run is abandoned before completion, the instrument will wash the particles off the plungers and eject the plungers into well #8 of the cartridge. The sample will be lost.

11. When the automated purification run is complete, the LCD screen will display a message that the method has ended.

End of Run

12. Follow on-screen instructions at the end of the method to open door. Verify that plungers are located in well #8 of the cartridge at the end of the run. If plungers are not removed from the magnetic plunger bar, push them down gently by hand to remove them.

13. Press the Run/Stop button to extend the platform out of the instrument.

14. Remove the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack from the instrument. Remove Elution Tubes containing DNA, and close the tubes.



Note: Following the automated purification procedure, the LEV Cartridge Rack will be warm. It will not be too hot to touch. To remove the rack from the instrument platform, hold onto the sides of the rack.



15. Remove the cartridges and plungers from the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack, and discard as hazardous waste. Do not reuse reagent cartridges, LEV Plungers or Elution Tubes.



# CARACTÉRISATION DU PHÉNOTYPE

## « YEUX BLEUS » CHEZ LE BEAGLE

**NOM et Prénom : SEIGNEURET Tatiana**

### Résumé

La présence d'iris de couleur bleue a été remarquée chez des beagles de pedigrees expérimentaux. Ces chiens présentaient des yeux vairons (un œil bleu et un œil marron) ou hétérochromiques (présence de plages bleues et marron dans le même iris) ou deux yeux bleus. Dans un premier temps, nous avons caractérisé le phénotype « yeux bleus » chez des beagles issus de pedigrees expérimentaux et étudié son impact sur l'œil au niveau anatomique et fonctionnel, en réalisant des examens ophtalmologiques et des ERG (électrorétinogramme). L'étude ophtalmologique a montré trois phénotypes différents : des yeux ayant un iris de couleur bleue présentant un fond d'œil peu pigmenté (majoritairement rouge) avec une absence de tapis ; des yeux avec une hétérochromie de l'iris montrant un fond d'œil avec tapis présentant plus ou moins de plages dépigmentées ; des yeux ayant un iris de couleur marron dévoilant un fond d'œil pigmenté avec un tapis. De plus, les courbes ERG ne présentaient pas de différences significatives entre les yeux de couleur bleue et les yeux de couleur marron. Ainsi, nous avons montré que la fonctionnalité de l'œil n'était pas modifiée par la couleur bleue de l'iris. Dans un second temps, à l'aide d'une cohorte de beagles issus de différents élevages expérimentaux européens et américains, nous avons tenté de vérifier le caractère héréditaire du phénotype « œil bleu », son éventuel mode de transmission, puis nous avons recherché la ou les mutations responsables de la couleur de l'iris en étudiant les gènes responsables du phénotype homologue chez l'homme. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une transmission génétique et très probablement polygénique. La méthode gène-candidat nous a permis d'identifier un SNP T/C dans l'intron 85 du gène *HERC2* du chien. Cependant, ce SNP ne présentait pas d'association avec la couleur des yeux.

**Mots clés :** GENETIQUE / HEREDITE / ŒIL / OPHTALMOLOGIE / YEUX BLEUS / ELECTRORETINOGRAMME / RACE CANINE / CARNIVORE / CHIEN / BEAGLE

### Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr Abitbol M.

Assesseur : Dr Chahory S.

Invitée: Dr Reynaud K.

# CHARACTERIZATION OF THE « BLUE-EYE » TRAIT IN BEAGLE DOGS

**SURNAME:** SEIGNEURET

**Given name:** Tatiana

## Summary

A “blue-eyes” phenotype has been reported in beagle dogs from experimental pedigrees. Dogs can have two blue eyes but they can also be odd-eyed (one blue eye and one brown eye) or have heterochromic eyes (part of the iris is a different colour from its remainder). We collected clinical and pedigree data from “blue-eyed” beagle dogs coming from various experimental pedigrees. First, we characterized the “blue eyes” phenotype and we studied its anatomic and functional impact thanks to ophthalmological examinations and ERGs (electroretinograms). Ophthalmological examinations revealed three different phenotypes: eye with a blue iris and a poor-pigmented fundus oculi (mainly red) and without tapetum ; eye with heterochromia and a tapetum with some depigmented parts ; brown eye with a pigmented fundus oculi and a tapetum. We identified no significant differences in ERG curves between brown and blue eyes. Thus we demonstrated that the eye function was not modified in blue-eyed beagles. Second, based on the study of several American and European beagle dogs, we tried to identify whether the “blue-eyes” phenotype was heritable or not. We concluded that the inheritance pattern was probably polygenic. Last, we analysed candidate genes involved in eye-colour in humans. We identified a SNP (single nucleotide polymorphism) in *HERC2* (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*) by sequencing. This SNP located in intron 85 of *HERC2*, further genotyped in our cohort of dogs, was not associated to the eye colour.

**Keywords:** GENETICS / HEREDITARY / EYE / OPHTHALMOLOGY / BLUE EYES / ELECTRORETINOGRAM / CANINE BREED / CARNIVORE / DOG / BEAGLE

## Jury:

President: Pr.

Director: Dr. Abitbol M.

Assessor: Dr. Chahory S.

Guest: Dr Reynaud K.