

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNEE 2009

**ANALYSE GENETIQUE DE LA SURDITE
DU DALMATIEN**



THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement
devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le

.....

par

Lucille, Gisèle, Suzanne BERENBAUM

Née le 10 Décembre 1983 à Paris 20^{ème} (Seine)

JURY

Président : M.....

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mr Laurent TIRET

Maître de Conférences en Physiologie & Thérapeutique à l'ENVA

Assesseur : Mlle Marie ABITBOL

Maître de Conférences en Génétique Médicale & Clinique à l'ENVA

Invité : Mr Dominique VINCENT

Docteur Vétérinaire

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard
Professeurs honoraires : MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques,**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

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

- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* - UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences - UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE Mme COMBRISON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences - UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. TISSIER Renaud, Maître de conférences* M. PERROT Sébastien, Maître de conférences - DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur - DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié	- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences - UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences - DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur - UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences* - UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences* M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences - DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE M. PHILIPS, Professeur certifié
--	---

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, Maître de conférences

- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences - UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel - UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences* M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) - DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences contractuel	- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. JARDEL Nicolas, Maître de conférences contractuel - UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier - DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences - UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences Mme HALOS Léniaïg, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier - DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur
--	---

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

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences - UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences - DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences	- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences* - UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences*
--	--

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur de la Faculté de Créteil d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie sincèrement le Docteur Tiret d'avoir accepté d'être directeur de cette thèse, d'avoir pris le temps de m'aider à la rédiger quitte à y consacrer ses soirées et ses week-ends.

Je tiens à remercier également le Docteur Abitbol d'avoir accepté d'être assesseur de cette thèse et de m'avoir donné goût à la génétique grâce à ses cours.

Je remercie également le Docteur Vincent, le Club Français du Dalmatien, Madame Corinne Lantais, Elinor Karlsson du Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technologie (MIT), USA pour l'envoi de la séquence corrigé du promoteur MITF-1M ainsi que le laboratoire Antagene pour les vérifications de parenté et les collaborations fructueuses sur les projets de l'UMR 955.

Merci à Sébastien, de tout mon coeur, de m'avoir toujours soutenue depuis le commencement de mes études. Sans lui cette thèse n'aurait jamais vu le jour et je n'aurais jamais pu espérer être là où j'en suis aujourd'hui.

Merci à mes parents, mes beaux-parents et mes grands parents d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir toujours fait confiance.

Merci à mes frères et soeurs d'être tous aussi proches de moi, je vous adore.

Merci à mes amis, au groupe 9, à mon ancienne et à mes p'tites poulottes

Enfin, merci à tous les vétérinaires que j'ai croisés sur ma route et qui m'ont tous à leur manière transmis la passion du métier : Dr LESSON, Véronique MAHEU, Frédérique TORDO, Drs MAROILLE, Pierre-François MAZEAUD, Nicolas SATTler, Emmanuel CARROZA, Frédéric DUMESNIL, Toute l'équipe des vétos d'EVron et bien sûr Régis FLEURISSON, François BEAUSSART, Christophe CICHY et Véronique MONNIER grâce à qui je prends plaisir tous les matins à aller travailler.

TABLE DES MATIERES

Liste des Figures	3
Liste des Tableaux	5
Liste des Abréviations	7
INTRODUCTION	9
<i>I. Données génétiques, cliniques et histo-pathologiques sur la surdité du dalmatien</i>	<i>11</i>
A. Clinique et diagnostic	11
1. Définition de la surdité et différents types	11
2. La méthode des Potentiels Evoqués Auditifs.....	13
B. Comparaisons anatomo-histologiques de l'oreille interne du dalmatien entendant et non entendant (d'après PETTON, 2002).....	17
1. Anatomie, histologie et innervation de l'oreille interne du dalmatien entendant	17
2. Modifications anatomo-histologiques de l'oreille interne du dalmatien non entendant.....	22
3. Altération du signal auditif chez le dalmatien sourd (PRESSNITZER, 2008).....	22
C. Mode de transmission de la surdité	23
D. Prévalence et association avec des marqueurs phénotypiques chez le dalmatien.....	23
1. Prévalence.....	23
2. Association avec des marqueurs phénotypiques.....	24
<i>II. Etiologie moléculaire de la surdité du dalmatien</i>	<i>27</i>
A. Absence de pigmentation de la strie vasculaire chez les dalmatiens non entendants	27
1. Rôle de l'endolymphe (DE CHEVEIGNE, 2000)	27
2. Absence de pigmentation chez les dalmatiens sourds et conséquences sur l'endolymphe ..	30
B. La mélanocytogenèse et la mélanogenèse dans la strie vasculaire	30
1. Les étapes de la mélanocytogenèse et mélanogenèse (AUBIN, 1997 ; DJIAN-ZAOUCHE, 2008)	30
a) Développement et migration des mélanoblastes	30
b) Différentiation des mélanoblastes en mélanocytes	32
b) Différentiation des mélanoblastes en mélanocytes	33
c) La mélanogenèse.....	33

2. Aperçu général sur la régulation génétique de la mélanocytogenèse (DJIAN-ZAUCHE, 2008).....	35
C. Le facteur de transcription MITF : protéine intégratrice clé dans la cascade régulatrice de la pigmentation (WIDLUND et FISHER, 2003)	41
1. Structure, expression, régulation et fonction de <i>MITF</i>	41
2. Les allèles du gène <i>Mitf</i> chez la Souris et du gène <i>MITF</i> chez l'Homme et leurs répercussions phénotypiques	46
3. Identification d'allèles de <i>MITF</i> associés à la couleur blanche chez le Chien.....	50
III. Etude expérimentale : analyse d'association entre la surdité du dalmatien et 2 allèles du gène MITF	53
A. Animaux, matériel et méthodes	53
1. Formation du pedigree	53
2. Extraction de l'ADN	53
3. Tests de filiation.....	54
4. Amplification des ADN par PCR	54
5. Analyse des amplicons.....	59
6. Bioinformatique	59
7. Statistiques.....	59
B. Résultats et discussion	60
1. Analyse du mode de transmission de la surdité.....	60
2. Recherche d'une association entre le phénotype des dalmatiens français et les polymorphismes de séquence dans le promoteur <i>MITF-M</i>	65
a) Identification <i>in silico</i> des séquences polymorphes du promoteur <i>MITF-M</i> canin	65
▫ Identification de la séquence du transcrit <i>MITF-M</i>	65
▫ Identification de la séquence promotrice du transcrit <i>MITF-M</i>	65
▫ Identification des régions promotrices contenant les polymorphismes préalablement associés à la robe blanche	68
b) Mise au point de l'amplification des régions polymorphes.....	70
▫ Amplification initiale des régions ciblées	70
▫ Correction d'une erreur d'annotation du génome de référence	76
▫ Reprise des conditions d'amplification du SINE.....	79
c) Analyse ciblée des polymorphismes dans notre pedigree	81
▫ Critères de choix pour sélectionner la famille analysée	81
▫ Analyse de l'insertion du SINE en position -3033	81
▫ Analyse du polymorphisme de longueur en position -91	89
CONCLUSION.....	97
Bibliographie.....	99

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Chiot dalmatien anesthésié au cours d’une séance d’enregistrement de Potentiels Evoqués Auditifs en stimulation aérienne. (d’après SIMEON et MONNEREAU, 2005).....	14
<u>Figure 2</u> :	Tracé des ondes des Potentiels Evoqués Auditifs associées aux différentes structures nerveuses qui les génèrent (d’après SIMEON et MONNEREAU, 2005) ...	14
<u>Figure 3</u> :	Représentation de deux tracés de Potentiels Evoqués Auditifs réalisés chez un chien souffrant de surdité de transmission dans le cas A) et de surdité de perception dans le cas B) (d’après SIMEON et MONNEREAU, 2005).....	15
<u>Figure 4</u> :	Tracé de Potentiels Evoqués Auditifs d’un chiot entendant unilatéral A) et d’un chiot sourd B)	16
<u>Figure 5</u> :	Anatomie de l’oreille interne et détail d’une spire de la cochlée en coupe transversale. Vue rostrale de l’oreille droite. (d’après EVANS, 1993).....	18
<u>Figure 6</u> :	Coupe histologique légendée d’une strie vasculaire de Mammifère (d’après M. LAVIGNE-REBILLARD http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric51/audition/francais/cochlea/stria/stria.htm)	19
<u>Figure 7</u> :	Diagramme en coupe de l’organe de Corti dans l’oreille interne de Mammifère (d’après ALBERTS <i>et al.</i> , 2000).....	20
<u>Figure 8</u> :	Composition ionique des liquides de l’oreille interne (d’après COULOIGNER <i>et al.</i> , 2004)	28
<u>Figure 9</u> :	Les échanges ioniques dans la strie vasculaire (d’après S. BLATRIX dans www.iurc.montp.inserm.fr/cric51/audition/francais/cochlea/cochlea.htm)	29
<u>Figure 10</u> :	Schéma du développement des crêtes neurales et de la formation à partir de la plaque neurale du tube neural. (d’après www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html)	31
<u>Figure 11</u> :	Les étapes de la mélanogenèse (d’après ALHAIDARI <i>et al.</i> , 1999).....	34
<u>Figure 12</u> :	Les étapes de la mélanocytogenèse (Modifié d’après ALHAIDARI <i>et al.</i> , 1999) .	36
<u>Figure 13</u> :	Structure de la protéine MITF codée par le gène <i>MITF-M</i> (d’après STEINGRIMSSON <i>et al.</i> , 1994)	42
<u>Figure 14</u> :	Le promoteur de <i>MITF</i> (d’après LIN et FISHER, 2007)	44
<u>Figure 15</u> :	Position des mutations connues sur la protéine MITF (d’après MOORE, 1995)	49
<u>Figure 16</u> :	Cartographie, par étude d’association, du locus responsable de la couleur blanche chez les boxers et les bull terriers (d’après KARLSSON et LINBALD-TOH, 2008).....	52
<u>Figure 17</u> :	Composition du mélange réactionnel et étapes de l’amplification élective des séquences d’intérêt	56
<u>Figure 18</u> :	Principe d’une PCR : <i>polymerase chain reaction</i> ou réaction de polymérisation en chaîne (d’après KRIEGER, 1999)	58
<u>Figure 19</u> :	Pedigree complet des dalmatiens inclus dans notre étude	63
<u>Figure 20</u> :	Détail d’une famille représentative pour les analyses de ségrégation et de polymorphismes de séquence	64
<u>Figure 21</u> :	Représentation graphique de la structure génomique du gène <i>MITF</i> canin (d’après www.ensembl.org).....	66

<u>Figure 22</u> :	Alignement nucléotidique entre les 120 premières bases de l'ADN complémentaire et la séquence génomique du gène <i>MITF</i> canin	67
<u>Figure 23</u> :	Séquence 35a du promoteur <i>MITF-M</i> canin et identification des amorces permettant l'amplification de cette séquence	69
<u>Figure 24</u> :	Liste des séquences utilisées pour l'amplification du SINE, de la séquence répétée et de l'exon 1 du gène <i>MITF</i>	71
<u>Figure 25</u> :	Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR de l'exon 1.....	73
<u>Figure 26</u> :	Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons la région présumée d'insertion du SINE. (première paire d'amorces dessinée à partir de la séquence du génome de référence)	74
<u>Figure 27</u> :	Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons de la séquence répétée	75
<u>Figure 28</u> :	Séquence génomique corrigée du promoteur <i>MITF-M</i> canin (données reçues d'Elinor KARLSSON après échanges d'e-mail)	77
<u>Figure 29</u> :	Alignement nucléotidique entre la version corrigée et la version publique (génome de référence) du polymorphisme de longueur contenu dans le promoteur <i>MITF-M</i>	78
<u>Figure 30</u> :	Alignement nucléotidique entre la version corrigée et la version publique (génome de référence) des séquences génomiques du promoteur <i>MITF-M</i>	78
<u>Figure 31</u> :	Composition des amorces utilisées pour l'amplification du SINE, déduites de la séquence corrigée	79
<u>Figure 32</u> :	Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons contenant la région d'insertion du SINE, obtenus à partir d'un panel de chiens de différentes races	80
<u>Figure 33</u> :	Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons contenant le SINE, obtenus à partir d'un panel représentatif de dalmatiens.....	82
<u>Figure 34</u> :	Chromatogramme représentatif de la séquence incluant le SINE (chiot n° 93) ..	84
<u>Figure 35</u> :	Alignement nucléotidique du SINE obtenus chez les dalmatiens avec celui identifié chez les labradors atteints de myopathie centronucléaire	86
<u>Figure 36</u> :	Alignement nucléotidique des amplicons contenant le SINE obtenus chez les dalmatiens de la famille testée	88
<u>Figure 37</u> :	Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons contenant le polymorphisme de longueur du promoteur <i>MITF-M</i> , obtenus à partir d'un panel représentatif de dalmatiens	90
<u>Figure 38</u> :	Chromatogramme représentatif de la séquence incluant le polymorphisme de longueur (chiot n° 86), obtenue à partir des amplicons séquencés en chimie classique [amorce M13 uni (-20)]	91
<u>Figure 39</u> :	Chromatogramme représentatif de la séquence incluant le polymorphisme de longueur (chiot n° 86), obtenue à partir des amplicons séquencés en chimie modifiée [amorce cMITF_Repetf]	92
<u>Figure 40</u> :	Chromatogramme représentatif de la séquence incluant le polymorphisme de longueur (chiot n° 86), obtenue à partir des amplicons séquencés en chimie modifiée [amorce M13 uni (-20)]	93
<u>Figure 41</u> :	Alignement nucléotidique partiel des 3 séquences obtenues à partir de l'amplification du polymorphisme de longueur du chiot n° 86	94

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Les différents types de surdité et leur étiologie (d'après SIMEON et MONNEREAU, 2005).....	12
<u>Tableau 2</u> : Données épidémiologiques et génétiques de la surdité chez le dalmatien	25
<u>Tableau 3</u> : Origine embryonnaire des mélanocytes chez les mammifères (d'après BOUCHARD, 1993).....	32
<u>Tableau 4</u> : Principaux gènes intervenant dans la mélanocytogenèse et noms des mutations de ces gènes connues chez l'Homme (BENNETT et LAMOREUX, 2003)	37
<u>Tableau 5</u> : Les Mutations du gène MITF chez la Souris et leurs conséquences phénotypiques (d'après www.informatics.jax.org).....	47
<u>Tableau 6</u> : Comparaison du nombre de dalmatiens sourds et entendants théorique avec celui observé dans notre pedigree	61

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMP	Adénosine Mono Phosphate
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARNt	Acide Ribonucléique de transfert
ATPase	Adénosine Tri Phosphatase
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Ca	Calcium
Cl	Chlore
dB	Décibel
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
f	Forward
K	Potassium
Kb	Kilobase
Mb	Mégabase
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µmol	Micromole
µV	Microvolt
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mosm	Milliosmolaire
ms	Milliseconde
mV	Millivolt
Na	Sodium
ng	Nanogramme
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEA	Potentiel Evoqué Auditif
r	Reverse
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

INTRODUCTION

Une majorité de surdités congénitales est héritée chez les Mammifères. Parmi elles, certaines sont syndromiques, c'est-à-dire associées à d'autres anomalies. Dans les années 50, il a été montré chez l'Homme qu'un défaut de pigmentation pouvait être associé à la surdité : c'est le cas des personnes atteintes du syndrome de Waardenburg. Ce même type d'association a été relevé chez la Souris avec la mutation *microphthalmia*, chez les chats blancs ou encore chez le Chien (STRAIN, 1999). De nombreuses races canines et félines sont aujourd'hui concernées par l'association entre ces deux anomalies. On peut ainsi citer, de façon non exhaustive, le siamois, le norvégien ou l'angora chez les chats ainsi que le boxer, l'américain staffordshire terrier ou le dalmatien chez les chiens.

Chez le dalmatien, la somme des défauts d'audition touchant une ou deux oreilles donne une prévalence de 20%. C'est donc une affection majeure dans cette race dont le mode de transmission non dominant rend la sélection des reproducteurs impossible. En effet, les reproducteurs porteurs sains continuent, malgré tous les efforts des clubs de la race, de transmettre les allèles de morbidité à leur descendance. Dans un tel cas, seul un test diagnostique fondé sur le génotype permettra d'identifier ces porteurs sains et ainsi, de sélectionner à terme les reproducteurs parmi les animaux non porteurs de la mutation causale. La première étape dans l'élaboration d'un tel test est l'identification des allèles morbides. En plus d'éliminer une anomalie héréditaire, cette étape permettra de caractériser un modèle animal spontané de maladie humaine, toujours apprécié pour sa valeur cognitive ainsi que pour la possibilité qu'il offre de tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Chez l'Homme et la Souris, il a été démontré que le gène *MITF* (*Microphthalmia Associated Transcription Factor*) porte des mutations responsables de dépigmentation et de surdité. Récemment, des polymorphismes dans le promoteur du gène *MITF* ont été découverts chez le Chien et sont associés à la couleur blanche chez le boxer, le bull terrier et vraisemblablement le dalmatien (KARSLSONN *et al.*, 2007). L'objectif de cette thèse est de vérifier l'hypothèse selon laquelle des variants alléliques de ces régions polymorphes pourraient également être associés à la surdité chez le dalmatien.

Dans une première partie, nous ferons un état des lieux sur les données cliniques, histo-pathologiques et génétiques de la surdité du dalmatien. Dans une deuxième partie, nous mettrons en évidence la relation entre défaut de pigmentation et survenue d'une surdité congénitale, en insistant plus particulièrement sur le rôle clé joué par le gène *MITF* dans la mise en place de la pigmentation. Enfin, la dernière partie, expérimentale, décrira notre approche visant à mettre en évidence une éventuelle association entre des allèles du gène *MITF* et la surdité chez des dalmatiens originaires d'élevages français.

I. Données génétiques, cliniques et histopathologiques sur la surdité du dalmatien

A. Clinique et diagnostic

1. Définition de la surdité et différents types

La surdité est un état pathologique caractérisé par une perte partielle ou totale du sens de l'ouïe.

La surdité peut être classée selon 5 critères (SIMEON et MONNEREAU, 2005) :

- le déterminisme de la surdité (génétique ou environnementale),
- le moment d'apparition,
- la gravité (partielle ou totale),
- la symétrie (uni ou bilatérale),
- l'étage anatomo-fonctionnel atteint : surdité de transmission ou de perception.

Les surdités de transmission correspondent aux atteintes de l'oreille externe et/ou moyenne tandis que les surdités de perception encore appelées surdités neurosensorielles correspondent aux atteintes de l'oreille interne ou des voies sensorielles de l'audition, représentées par les nerfs cochléaires et les voies nerveuses centrales de l'audition. Les différentes causes responsables de l'un ou l'autre type de surdité sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les différents types de surdité et leur étiologie (d'après SIMEON et MONNEREAU, 2005)

<i>Surdité de transmission</i>	<i>Surdité de perception</i>
Otites externes et/ou moyennes	Méningite et/ou encéphalite
Ototoxicité	Ototoxicité
Chirurgie de l'oreille externe et/ou moyenne	Traumatisme acoustique
Malformations congénitales concernant les oreilles externe et/ou moyenne	Dégénérescence héréditaire des structures cochléaires = surdité endocochléaire
Tumeurs auriculaires	Hypothyroïdie
Presbycousie	Surdité idiopatique du cavalier king charles de deux ans
	Tumeurs de l'angle ponto-cérébelleux
	Tumeurs du tronc cérébral
	Défaut de vascularisation artérielle de la cochlée
	Presbycousie

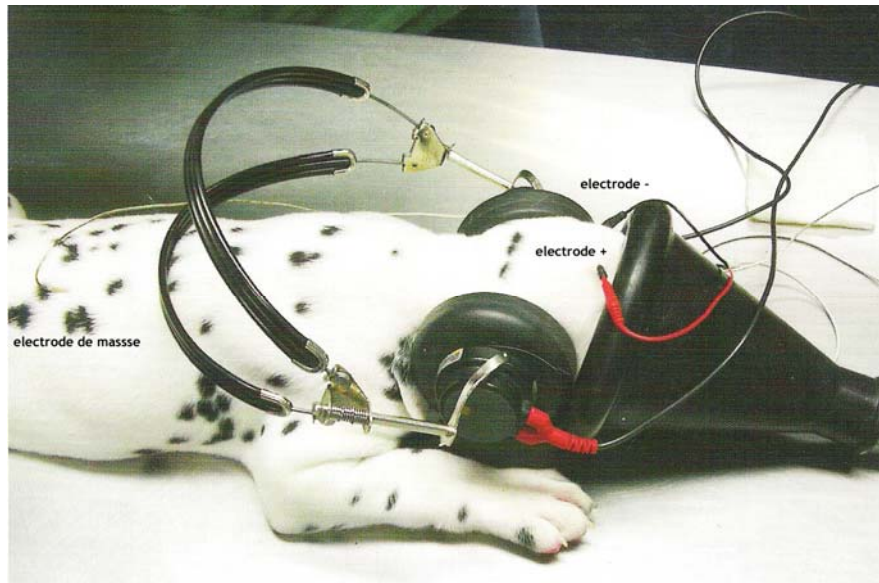
La surdité héréditaire du dalmatien est classée dans le groupe des surdités de perception endocochléaire. En effet, l'examen clinique des animaux, en particulier l'examen à l'otoscope, ne révèle jamais d'anomalies de l'oreille externe ni du tympan chez les dalmatiens sourds. L'examen neurologique de routine est également normal. L'examen nécropsique de dalmatiens sourds révèle quant à lui de nombreuses anomalies de l'oreille interne qui seront détaillées pages 22 et 23 de cette thèse.

2. La méthode des Potentiels Evoqués Auditifs

La surdité chez le dalmatien étant héréditaire, ne pas mettre à la reproduction un individu sourd bilatéral ou unilatéral paraît évident. Un diagnostic de l'affection est désormais pratiqué régulièrement dans les élevages français. Aucun test génétique pouvant à la fois détecter individus atteints et porteurs sains n'étant disponible, seul un test phénotypique peut être utilisé. Les modalités de ce test diagnostique sont liées aux caractéristiques de l'affection : il doit permettre la détection des animaux sourds unilatéraux, il doit pouvoir mettre en évidence une surdité de perception endocochléaire et doit pouvoir être réalisé chez des animaux de tout âge depuis le chiot jusqu'au dalmatien adulte.

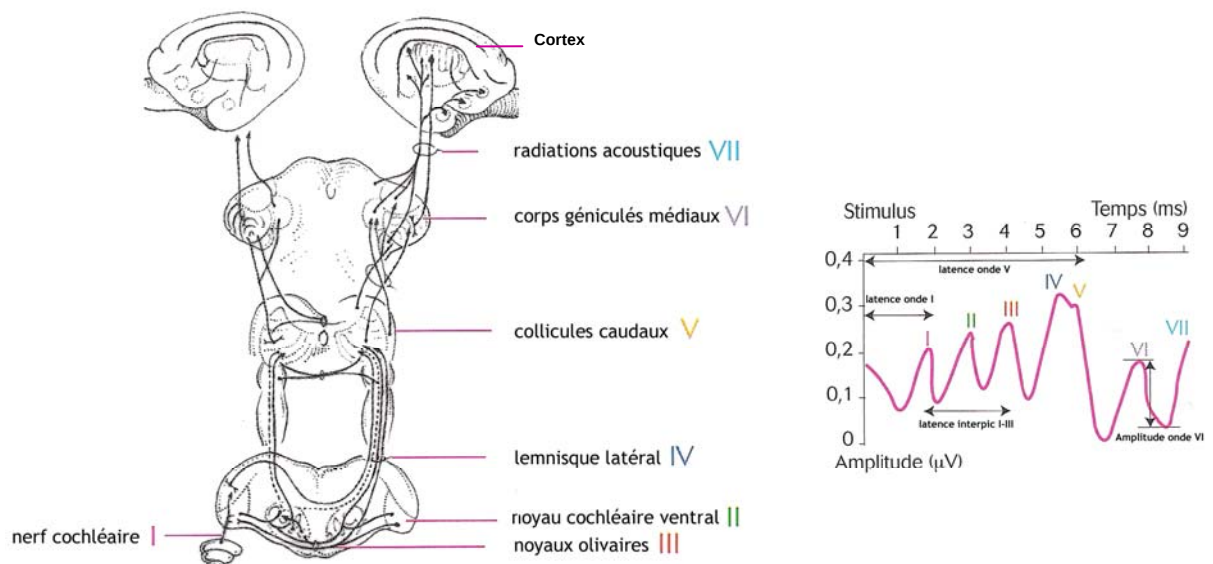
La méthode diagnostique utilisée aujourd'hui est l'enregistrement de Potentiels Evoqués Auditifs (ou PEA). Le principe de cette méthode est l'application à une seule oreille à la fois de stimulations sonores aériennes (en général des clics) ou de stimulation mécaniques osseuses (application de vibrations directement sur la tête de l'animal). On enregistre ensuite, grâce à un appareil électrodiagnostique, la succession de potentiels nerveux qui correspond au cheminement des influx nerveux dans les différentes structures sensorielles auditives (Figures 1 et 2).

Figure 1 : Chiot dalmatien anesthésié au cours d'une séance d'enregistrement de Potentiels Evoqués Auditifs en stimulation aérienne. (d'après SIMEON et MONNEREAU, 2005)



Légende : Des électrodes sous cutanées, positive, négative et de masse sont mises en place. Le casque délivre les stimuli auditifs.

Figure 2 : Tracé des ondes des Potentiels Evoqués Auditifs associées aux différentes structures nerveuses qui les génèrent (d'après SIMEON et MONNEREAU, 2005)

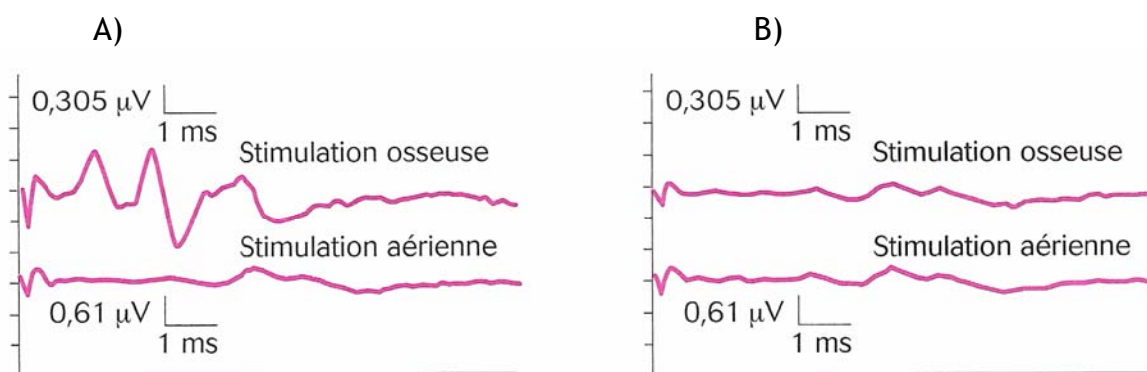


Légende : La première onde enregistrable est générée par le nerf cochléaire (I) puis par six structures nerveuses (notées II à VII)

Cette méthode est particulièrement avantageuse car elle répond aux trois problématiques citées ci-dessus :

- Elle peut se réaliser chez le chiot dès l'âge de 5 semaines,
- Elle permet de différencier les surdités de transmission et de perception, (Figure 3)
- Elle permet de mettre en évidence à la fois les surdités bi et unilatérales car les deux oreilles sont testées indépendamment et individuellement (Figure 4). En effet, l'oreille qui n'est pas testée est protégée par un filtre qui empêche le passage des sons (PONCELET *et al.*, 2006).

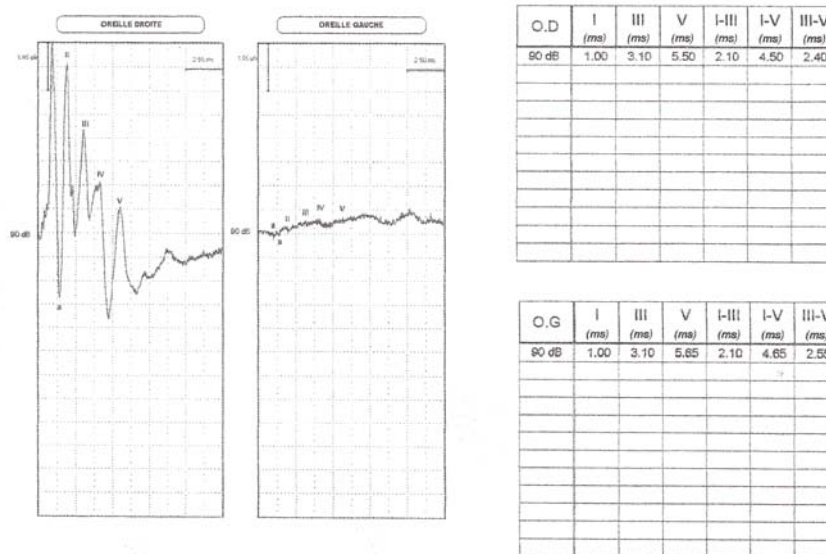
Figure 3 : Représentation de deux tracés de Potentiels Evoqués Auditifs réalisés chez un chien souffrant de surdité de transmission dans le cas A) et de surdité de perception dans le cas B) (d'après SIMEON et MONNEREAU, 2005)



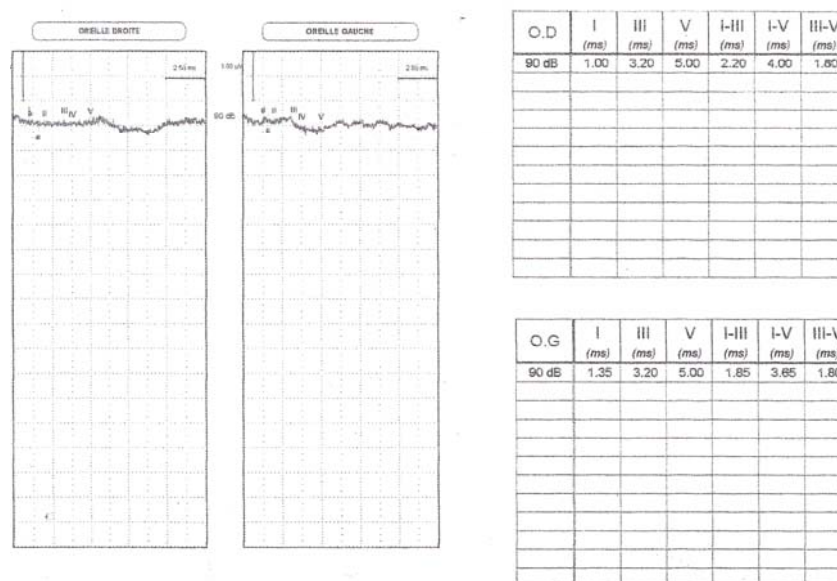
Légende : On note une absence d'onde enregistrable chez le chien souffrant de surdité de perception (B), alors que des ondes sont enregistrées lors de la stimulation osseuse chez le chien souffrant de surdité de transmission (A). L'oreille de ce chien ne génère cependant pas de PEA en stimulation aérienne.

Figure 4 : Tracé de Potentiels Evoqués Auditifs d'un chiot entendant unilatéral A) et d'un chiot sourd B)

A)



B)



Légende : Les latences individuelles ainsi que celles entre les ondes (entre les ondes I et III, I et V et entre III et V) sont mesurées, après une stimulation aérienne de 90 décibels

I : Nerfs cochléaire
 II : Noyau cochléaire ventral
 III : Noyaux olivaires
 IV : Lemnisque médial
 V : Collicules caudaux

B. Comparaisons anatomo-histologiques de l'oreille interne du dalmatien entendant et non entendant (d'après PETTON, 2002)

1. Anatomie, histologie et innervation de l'oreille interne du dalmatien entendant

a) Anatomie et histologie

L'oreille interne, ou labyrinthe, est constituée d'un système de conduits membraneux appelé labyrinthe membraneux. Le labyrinthe osseux est un système de cavités osseuses situé dans l'os temporal. Entre les deux, l'espace est rempli par la périlymphe. Le labyrinthe membraneux est rempli d'un liquide, l'endolymphe.

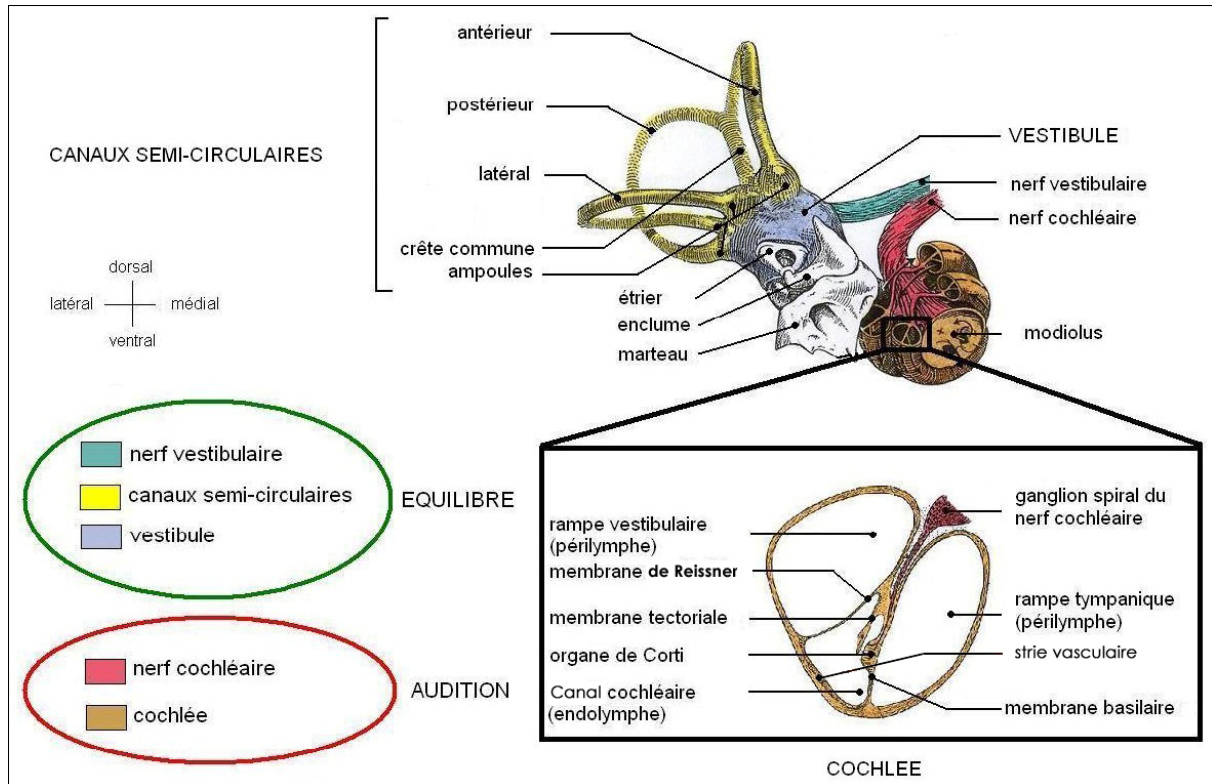
L'oreille interne rassemble six organes munis de cellules ciliées et dont chacun assure une fonction précise (Figure 5) :

- l'appareil cochléaire, ou cochlée. C'est l'organe de l'ouïe,
- l'appareil vestibulaire, organe de l'équilibration, regroupant les trois canaux semi-circulaires et leurs ampoules. C'est le détecteur des accélérations angulaires,
- l'utricule et le saccule. Ce sont les détecteurs des accélérations linéaires.

La cochlée est l'organe de l'audition, elle reçoit et transforme l'information acoustique destinée au système nerveux central. Elle consiste en un cône central, la columelle, autour de laquelle s'enroule un tube dont le diamètre des spires va en décroissant. Sur une coupe transversale, ce tube apparaît divisé en trois compartiments accolés (Figure 5) :

- au centre se trouve le canal cochléaire délimité par la membrane de Reissner en partie supérieure, la strie vasculaire en partie externe et la membrane basilaire en partie inférieure,
- en partie supérieure, se trouve la rampe vestibulaire qui fait suite au vestibule et à la fenêtre ovale,
- en partie inférieure, se trouve la rampe tympanique qui aboutit à la fenêtre ronde,
- l'organe de Corti, organe récepteur du son, sera détaillé page 20.

Figure 5 : Anatomie de l'oreille interne et détail d'une spire de la cochlée en coupe transversale. Vue rostrale de l'oreille droite. (d'après EVANS, 1993)

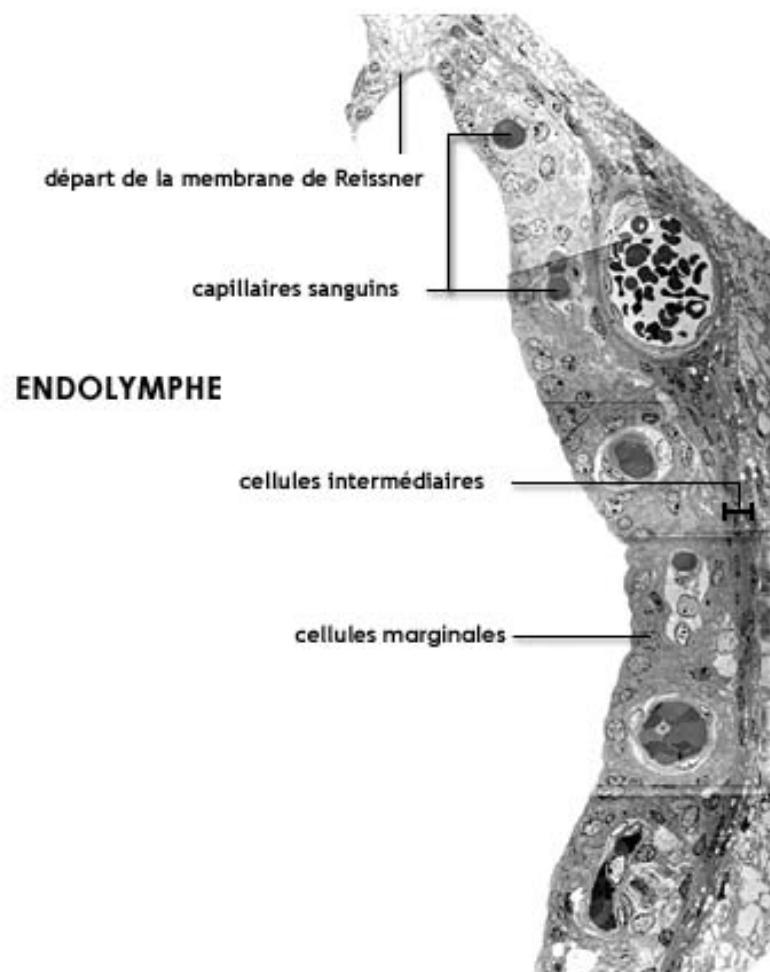


Légende : L'oreille interne joue un rôle clé dans l'audition grâce à la cochlée et dans l'équilibration grâce à l'appareil vestibulaire. Ce dernier permet la détection des accélérations angulaires tandis que l'utricule et le saccule permettent la détection des accélérations linéaires.

Au centre de la cochlée, le canal cochléaire contient l'endolymphe. Il est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner, elle-même attachée sur la strie vasculaire. Le canal cochléaire est également séparé de la rampe tympanique par la membrane basilaire. Il contient l'organe de Corti dont les cellules ciliées vont assurer l'amplification, la sélectivité et au final la transduction de l'énergie mécanique en énergie électrique.

Le canal cochléaire contient de l'endolymphe. Elle est produite principalement par la strie vasculaire (Figure 6), tissu épithélial dense qui contient un complexe de capillaires entourés de deux types cellulaires : les cellules marginales et les cellules intermédiaires. Ces dernières sont des mélanocytes qui dérivent de la crête neurale.

Figure 6 : Coupe histologique légendée d'une strie vasculaire de Mammifère observée en microscopie électronique (d'après M. LAVIGNE-REBILLARD
<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric51/audition/francais/cochlea/stria/stria.htm>)

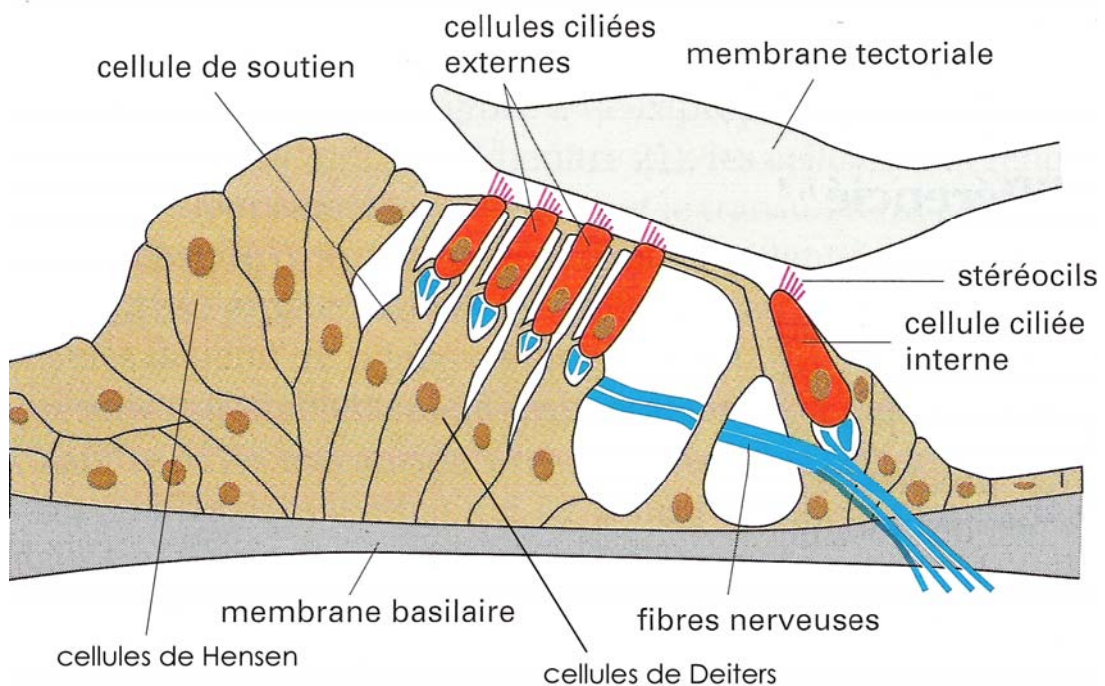


Légende : Les cellules intermédiaires sont des mélanocytes qui dérivent de la crête neurale. Les cellules marginales isolent la strie vasculaire du cartilage environnant

Les rampes tympaniques et vestibulaires sont remplies d'un liquide dont la composition diffère de celle de l'endolymphe, la périlymphe. Elle est d'origine mixte, composée par un mélange alliant du liquide issu de l'ultrafiltration plasmatique et du liquide cérébro-spinal (LCS) qui s'écoule dans la rampe tympanique via l'aqueduc cochléaire. Ce dernier met en communication le LCS et la rampe tympanique.

Sur la membrane basilaire, repose l'organe de Corti, un neuroépithélium contenant des cellules ciliées sensorielles. Il représente l'organe récepteur du son proprement dit. Ces cellules, dotées de stéréocils, sont situées de part et d'autre du tunnel de Corti. Il contient également deux types de cellules de soutien, les cellules de Deiters et les cellules de Hensen. L'organe de Corti est baigné de périlymphe provenant de la rampe tympanique.

Figure 7 : Diagramme en coupe de l'organe de Corti dans l'oreille interne de Mammifère (d'après ALBERTS *et al.*, 2000)



Légende : L'organe de Corti est constitué de deux types de cellules ciliées qui reposent sur la membrane basilaire par l'intermédiaire de cellules de soutien. La membrane tectoriale est un gel glycoprotéique qui suit les oscillations de la membrane basilaire. Les relations entre la membrane tectoriale et les cils des cellules ciliées ne sont pas encore bien comprises.

Les cellules ciliées sont disposées de la base au sommet de la cochlée, en rangées parallèles :

- une rangée de cellules, dites internes, est située entre l'axe et le pilier interne,
- trois à quatre rangées de cellules, dites externes, sont situées au-delà du pilier externe.

Les cellules externes et internes diffèrent par leur forme et leur structure. La base des cellules ciliées repose sur la membrane basilaire par l'intermédiaire des cellules de soutien. La membrane basilaire est une structure élastique qui transmet aux cellules ciliées la vibration des liquides endocochléaires.

b) Innervation

La cochlée est innervée par trois types de fibres : les fibres afférentes, les fibres efférentes et les fibres sympathiques.

Les fibres afférentes, les plus nombreuses, transmettent l'influx nerveux né au pôle inférieur des cellules ciliées vers les noyaux auditifs du tronc cellulaire.

Elles se distribuent aux cellules ciliées suivant deux faisceaux, le faisceau radial et le faisceau spiral.

- le faisceau radial innerve les cellules ciliées internes et représente 95% du nombre total des fibres afférentes chez l'animal,
- Le faisceau spiral se distribue aux cellules ciliées externes et ne représente que 5% des fibres afférentes,

Ainsi, les cellules ciliées externes qui représentent 75% des récepteurs cochléaires ne sont innervées que par 5% des fibres du nerf cochléaire.

Les fibres efférentes sont beaucoup moins nombreuses mais très ramifiées.

- les fibres efférentes destinées aux cellules ciliées internes ont une distribution spirale et établissent des synapses avec les fibres radiales afférentes,
- les fibres efférentes destinées aux cellules ciliées externes sont de grosses fibres à distribution radiale.

Les fibres sympathiques proviennent du ganglion cervical et constituent un plexus adrénergique.

2. Modifications anatomo-histologiques de l'oreille interne du dalmatien non entendant

Chez l'animal sourd, les modifications de l'appareil auditif sont liées à une dégénérescence de l'appareil endocochléaire. Plus précisément, cette dégénérescence serait due à la présence de mélanocytes anormaux dans la strie vasculaire (STEEL et BARKWAY, 1989). L'absence de mélanine dans ces cellules empêche, comme nous le verrons page 27, une bonne homéostasie de l'endolymph et, par voie de conséquence, induit un dysfonctionnement de l'ensemble de l'oreille interne qui finit par dégénérer. Ce processus de dégénérescence est achevé à l'âge de 5 semaines. L'examen histologique de l'oreille interne chez des chiots dalmatiens de 6 semaines révèle alors les anomalies suivantes (BRANIS et BURDA, 1985) :

- atrophie de la strie vasculaire,
- collapsus du canal cochléaire avec coalescence des trois membranes qui la délimitent,
- effondrement de la membrane de Reissner,
- atrophie de la membrane basilaire et de la membrane tectoriale, cette dernière pouvant être calcifiée,
- dégénérescence de l'organe de Corti avec diminution du nombre des cellules ciliées internes et externes.

La dégénérescence des structures nerveuses, consécutive à la dégénérescence cochléaire, est plus lente et s'étale sur des mois ou des années. A quelques mois d'âge, les cellules du ganglion spiral commencent à disparaître. Elles sont encore en nombre normal à 3 mois. A un an, seules les cellules au milieu du noyau ont commencé à dégénérer. A 18 mois, le nombre de cellules encore présentes est très réduit.

Parallèlement, on observe au fil des mois une diminution de la taille des cellules des noyaux cochléaires, ainsi qu'une modification de leur structure interne. En effet, les corps de Nissl sont moins colorés et s'accumulent autour du noyau lui-même plus petit et plus pâle.

Cette atrophie des cellules nerveuses serait secondaire à l'inactivité nerveuse. Il a en effet été constaté que plus l'activité neuronale est importante, plus la taille des cellules nerveuses est importante et inversement (NIPARKO et FINGER, 1997).

3. Altération du signal auditif chez le dalmatien sourd (PRESSNITZER, 2008)

La perception du son chez l'animal normal est la suivante. Le son arrive à l'oreille de l'animal, il entre dans le pavillon et chemine dans le conduit auditif jusqu'au tympan. Les vibrations de l'onde sonore mettent en mouvement le tympan lié aux osselets (le marteau, l'étrier et l'enclume). Ces premières étapes amplifient les vibrations qui atteignent la cochlée, l'organe récepteur de l'audition.

Chaque vibration, caractérisée par sa fréquence et son intensité, circule dans la spirale de la cochlée où elle est captée par les cellules ciliées de l'organe de Corti. Ces dernières transforment la vibration en signal électrique qui circule dans le nerf auditif. (voir II. A. 1.). L'information se dirige ensuite vers le cortex cérébral via plusieurs relais : le noyau cochléaire, le complexe olivaire, le noyau du lemnisque médial, le colliculus inférieur et le corps genouillé médian du thalamus.

Chez le dalmatien sourd, l'absence de mélanocytes dans l'oreille interne entraîne des modifications de l'endolymphe aboutissant à l'incapacité pour les cellules ciliées de transformer les vibrations en signal électrique, ce qui sera détaillé dans la partie II. A.

C. Mode de transmission de la surdité

Depuis la fin du vingtième siècle, plusieurs auteurs tels que STRAIN *et al.* (1992) ou WOOD et LAKHANI (1998) ont clairement démontré la transmission héréditaire de la surdité chez le dalmatien. Le mode exact de ségrégation est par ailleurs encore discuté. Il est désormais accepté que l'existence d'un gène unique, avec une transmission mendélienne simple, n'est pas possible. Les discussions portent aujourd'hui sur l'existence d'un seul gène majeur, de plusieurs gènes majeurs ou d'un modèle polygénique. Suite à une étude réalisée sur 605 dalmatiens originaires de Californie, FAMULA *et al.* (2001) a conclu à la présence d'un gène majeur probablement récessif, ne pouvant expliquer à lui seul l'incidence de la surdité dans la race. Un an plus tard, l'équipe Suisse de MUHLE *et al.* (2002), parvenait aux mêmes conclusions en ajoutant que le gène majeur récessif avait probablement une pénétrance incomplète. Cependant, en 2003, une équipe américaine, dans laquelle travaillaient STRAIN et FAMULA n'a pas pu prouver que cette hypothèse était statistiquement significative (CARGILL *et al.*, 2004) (Tableau 2).

D. Prévalence et association avec des marqueurs phénotypiques chez le dalmatien

1. Prévalence

La prévalence de la surdité chez le dalmatien est estimée entre 16% et 30% lorsque l'on compare les différentes études réalisées depuis les quinze dernières années. On note que la prévalence de la surdité unilatérale est toujours plus élevée que celle de la surdité bilatérale puisqu'elle est comprise entre 9.4% et 21.9% alors que l'intervalle correspondant à la surdité bilatérale est de 5 à 8.1% (Tableau 2).

De plus, on remarque que la prévalence ne diminue pas au cours du temps démontrant qu'en dépit des efforts réalisés par le club de la race, les éleveurs de dalmatiens n'ont pas réussi à mettre en place des mesures efficaces visant à diminuer la prévalence de l'affection.

2. Association avec des marqueurs phénotypiques

Plusieurs chercheurs ont tenté de mettre en évidence une corrélation positive ou négative entre la surdité du dalmatien et des facteurs phénotypiques afin de pouvoir mettre en place des mesures de prévention. Les principaux facteurs étudiés furent une étendue très large du blanc de la robe (autrement dit, une faible surface des spots de pigmentation), la présence et la couleur d'un patch (tache noire présente dès la naissance), la couleur de l'iris et le sexe. Aucune corrélation n'ayant jamais été retrouvée entre les caractéristiques des spots et la surdité, les chercheurs se sont intéressés plus particulièrement au trois autres caractères phénotypiques.

Il a ainsi été montré que la présence d'un patch à la naissance était corrélée négativement à l'apparition d'une surdité uni ou bilatérale alors que la présence d'un ou de deux yeux bleus était toujours corrélée positivement à la présence d'anomalies auditives pour un chiot, augmentant de près de 20% le risque de surdité (STRAIN, 2004).

Les chiots ayant deux yeux bleus ont plus de chance d'être sourds d'au moins une oreille par rapport aux chiots n'ayant pas d'yeux bleus (HOLLIDAY *et al.*, 1992). L'existence d'une corrélation entre le sexe et la surdité est plus controversée. Certaines études mettent en évidence une plus grande prévalence de la surdité chez les femelles que chez les mâles (WOOD et LAKHANI, 1998) ainsi qu'une fréquence plus élevée d'individus avec au moins un œil bleu chez les femelles (HOLLIDAY *et al.*, 1992). D'autres études, en particulier les études les plus récentes, n'ont pas permis de retrouver cette corrélation (STRAIN, 2004). On peut cependant noter que tous les chercheurs s'accordent à dire qu'un chiot n'a pas plus de risque d'être sourd lorsque la mère est atteinte de surdité plutôt que le père (Tableau 2).

Tableau 2 : Données épidémiologiques et génétiques de la surdité chez le dalmatien

Auteurs	Nombre de chiens	Mode de transmission présumé	Prévalence	Association surdité/sexe	Corrélation surdité/un ou deux yeux bleus	Corrélation surdité/présence de patch
Holliday <i>et al.</i> 1992	900	-	entendant 72% sourde unilatérale 21% sourde bilatérale 7%	positive : fréquence supérieure chez les femelles	positive	-
Strain <i>et al.</i> 1992	1031	-	entendant 70,3% sourde unilatérale 21,6% sourde bilatérale 8,1%	pas de corrélation	positive	négative
Wood et Lakhani 1997	1234	-	entendant 81,6% +/-1,5 sourde unilatérale 13,1% +/-1,0 sourde bilatérale 5,3% +/-1,1	positive : fréquence supérieure chez les femelles	-	-
Famula <i>et al.</i> 2000	3101	-	entendant 75% sourde unilatérale 18% sourde bilatérale 7%	positive : fréquence supérieure chez les femelles	positive	négative
Famula <i>et al.</i> 2001	552	1 gène majeur récessif	entendant 84% sourde unilatérale 11% sourde bilatérale 5%	pas de corrélation	positive	négative
Muhle <i>et al.</i> 2002	575	1 gène majeur récessif à pénétrance incomplète	entendant 83,5% sourde unilatérale 9,4% sourde bilatérale 7,1%	pas de corrélation	positive	négative
Cargill <i>et al.</i> 2003	199	aucun modèle n'est significativement acceptable	entendant 74,4% sourde unilatérale 18,1% sourde bilatérale 7,5%	-	-	-
Strain 2003	5333	-	entendant 70,1% sourde unilatérale 21,9% sourde bilatérale 8,0%	pas de corrélation	positive	-

II. Etiologie moléculaire de la surdité du dalmatien

La corrélation entre des défauts de pigmentation et la surdité met en évidence l'importance fonctionnelle de cette pigmentation dans la physiologie auditive. Le lien de cause à effet, longtemps ignoré, est aujourd'hui relativement bien établi. Il implique un mécanisme physiopathologique fondé sur des échanges ioniques cochléaires perturbés.

A. Absence de pigmentation de la strie vasculaire chez les dalmatiens non entendants

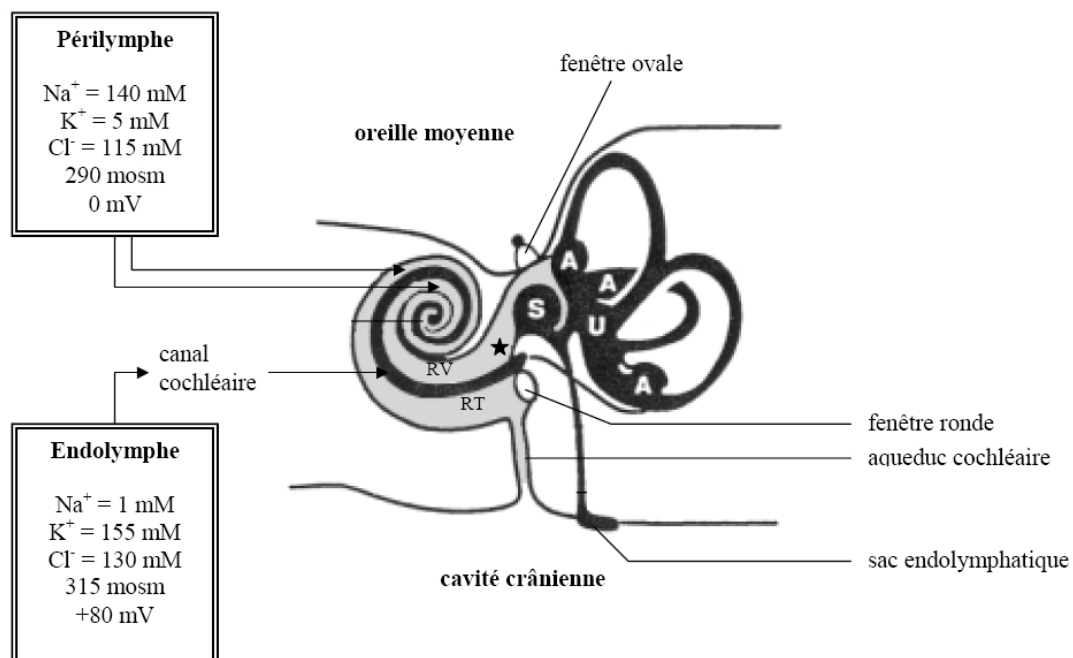
1. Rôle de l'endolymphe (DE CHEVEIGNE, 2000)

L'oreille interne permet de recevoir et de convertir une information acoustique destinée au système nerveux central. Ce rôle est assuré principalement par les cellules ciliées internes, les cellules ciliées externes étant des cellules motrices, amplificatrices du signal de départ.

La zone apicale des cellules ciliées baigne dans l'endolymphe alors que la partie basale baigne dans la périlymphe. Les deux liquides ont des caractéristiques très différentes tant par leur composition ionique que par leur potentiel électrique. En effet, l'endolymphe a une composition proche de celle du liquide intracellulaire. Elle est riche en potassium, pauvre en sodium et en calcium. La périlymphe se rapproche plus de la composition du liquide extracellulaire, riche en sodium et en potassium (Figure 8).

La composition de l'endolymphe est maintenue par la strie vasculaire. Les cellules marginales, les cellules intermédiaires et les fibroblastes qui la composent sont reliés entre eux par des jonctions gap ce qui indique l'existence d'échanges ioniques entre ces trois types cellulaires. Des transporteurs actifs (pompes Na/K ATPase) situés sur la membrane des cellules basilaires, permettent la sécrétion d'ions K⁺ dans l'endolymphe (Figure 9).

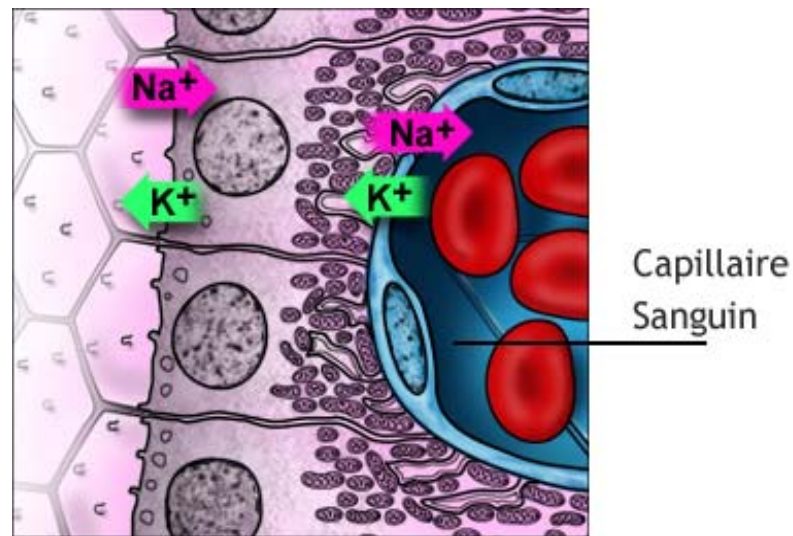
Figure 8 : Composition ionique des liquides de l'oreille interne
(d'après COULOIGNER *et al.*, 2004)



Légende :

- A : ampoule des canaux semi-circulaires
- RT : rampe tympanique
- RV : rampe vestibulaire
- S : saccule
- U : utricle
- * : canal de Hensen

Figure 9 : Les échanges ioniques dans la strie vasculaire (d'après S. BLATRIX dans www.iurc.montp.inserm.fr/cric51/audition/français/cochlea/cochlea.htm)



Légende : La composition ionique de l'endolymphe est assurée par des transports actifs et échanges d'ions au niveau des cellules marginales de l'épithélium de la strie vasculaire. Des échanges ioniques se font avec les capillaires et avec les autres cellules de la strie vasculaire et les fibroblastes qui jouent un rôle essentiel dans le recyclage du potassium (K^+).

Ainsi, il se crée une différence de potentiel de +80 mV entre l'endolymphe et la périlymphe, appelée potentiel endocochléaire. C'est la pile de l'oreille. Le potentiel intracellulaire des cellules ciliées est intermédiaire entre les deux valeurs de potentiel des deux liquides. Une déformation mécanique des cils suite à l'audition d'un son, provoque l'ouverture de sortes de «trappes» à la surface des cils, et laisse passer des ions entre l'endolymphe et le milieu intracellulaire. Il en résulte une modification du potentiel intracellulaire qui déclenche la sécrétion de neurotransmetteurs. Ceux-ci excitent alors les fibres nerveuses innervant la cellule et il y a création d'un potentiel d'action.

2. Absence de pigmentation chez les dalmatiens sourds et conséquences sur l'endolymphe

L'absence de mélanine dans les cellules de la strie vasculaire est un facteur crucial du mécanisme physiopathologique conduisant à la surdité.

La mélanine joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie de l'oreille interne via le stockage et le relargage d'ions calcium dans l'endolymphe (BUSH et SIMON, 2007). Elle représente un véritable réservoir biologique pour ces ions et agit comme un système tampon intracellulaire de cet ion. Les conséquences de l'absence de mélanine dans l'oreille interne sont graves. N'étant plus là pour réguler l'homéostasie calcique dans la cellule intermédiaire, tous les potentiels intracellulaire des cellules de la strie vasculaire se trouvent perturbés (nous avons en effet vu précédemment qu'il existe une collaboration étroite entre les différents types cellulaires de la strie vasculaire). Les cellules basales ne peuvent alors plus excréter les ions potassium dans l'endolymphe et le potentiel endocochléaire disparaît.

B. La mélanocyto-genèse et la mélanogenèse dans la strie vasculaire

1. Les étapes de la mélanocyto-genèse et mélanogenèse (AUBIN, 1997 ; DJIAN-ZAUCHE, 2008)

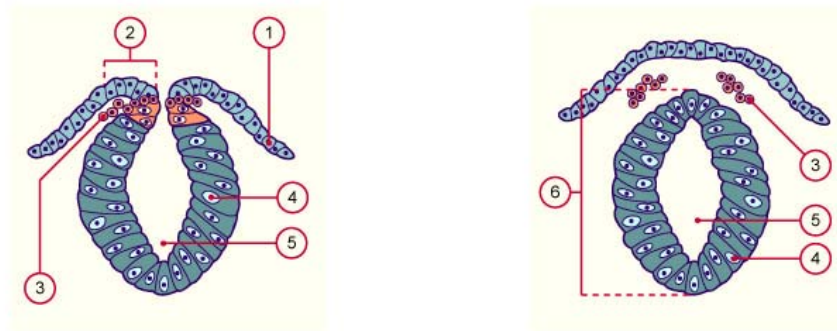
La mélanocyto-genèse est couramment subdivisée en quatre étapes :

- Le développement et la migration des mélanoblastes depuis la crête neurale vers les sites périphériques,
- La différenciation des mélanoblastes en mélanocytes,
- La survie et la prolifération des mélanocytes,
- La synthèse de la mélanine ou mélanogenèse.

a) Développement et migration des mélanoblastes

Les crêtes neurales sont des structures transitoires des embryons de Vertébrés, qui apparaissent à la jonction entre l'ectoderme et le tube neural. Les cellules de la crête neurale s'individualisent lors de la fermeture de la gouttière neurale. Elles migrent jusqu'à des sites précis où elles achèvent leur différenciation (Figure 10).

Figure 10 : Schéma du développement des crêtes neurales et de la formation à partir de la plaque neurale du tube neural. (d'après www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html)



- Légende :**
- 1. épiblaste
 - 2. bourrelets neuraux
 - 3. cellules des crêtes neurales en migration
 - 4. neuroépithélium
 - 5. canal épendymaire
 - 6. tube neural

Les cellules de la crête neurale s'individualisent lors de la fermeture de la gouttière neurale avant de migrer

Les crêtes neurales sont à l'origine de la plupart des cellules pigmentaires du corps des vertébrés (Tableau 3).

La destinée des cellules de crête neurale est restreinte en fonction de leur site d'origine le long de l'axe neural. Des cellules de crêtes neurales sont déterminées en tant que mélanoblastes dans la zone de migration constituée par l'espace situé entre la surface dorsale du tube neural, les somites et l'épiderme.

Les mélanocytes empruntent différents trajets pour atteindre l'oreille interne.

Certains d'entre eux, qui semblent plutôt appartenir à la lignée de mélanocytes des méninges, entrent dans la columelle par le méat interne.

Les mélanocytes que l'on retrouve dans les différents épithélia de l'oreille interne (vestibule et strie vasculaire) proviennent d'une population particulière qui migre à partir du mésenchyme du derme. La pénétration à travers la lame basale (qui disparaîtra rapidement après maturation de la strie vasculaire) des cellules marginales amorce le développement de la strie vasculaire embryonnaire (PETERS *et al.*, 1995). La strie vasculaire se transformera depuis un simple épithélium en une structure complexe, richement vascularisée.

Tableau 3 : Origine embryonnaire des mélanocytes chez les mammifères
(d'après BOUCHARD, 1993)

Site de différenciation des mélanocytes	Origine embryonnaire	
	CRETES NEURALES	CUPULE OPTIQUE
	Follicules pileux	Epithélium pigmentaire de la rétine
	Epiderme	
	Derme	
	Choroïde	
	Glande de Harder	
	Strie vasculaire	

b) Différentiation des mélanoblastes en mélanocytes

Un mélanocyte complètement différencié est caractérisé par son activité tyrosinase, la présence de mélanosomes matures dans son cytoplasme et sa forme dendritique. Les Mélanosomes sont des lysosomes modifiés, spécifiques des mélanocytes. Contrairement à la majorité des cellules différenciées, le mélanocyte conserve un potentiel mitotique. Dans l'oreille interne, la production de mélanosomes augmente énormément après la pénétration des mélanoblastes à travers la lame basale quelques jours à quelques semaines après la naissance (10 jours chez le Rat, environ quatre semaines chez le Chien).

Cette période où le nombre de mélanosomes augmente à grande vitesse coïncide avec le développement de prolongements dendritiques sur les mélanocytes. Ces derniers établissent alors des interdigitations avec les projections baso-latérales des cellules marginales et des autres composants de la strie vasculaire. La production de mélanosome est ensuite très fortement réduite voire stopper puis le nombre de mélanosomes se met à diminuer rapidement suite à une digestion lysosomale. La production de mélanosomes semble s'arrêter après que les cellules intermédiaires aient tissé des relations structurales très étroites dans la strie vasculaire.

Dans la cochlée de l'adulte aucun signe précis d'une production de mélanosome n'a été observé dans les cellules intermédiaires.

Ce n'est qu'une fois la structure de la strie vasculaire terminée que l'oreille interne devient fonctionnelle puisque avant, l'endolymph n'a pas encore acquis la composition ionique de celle d'un adulte.

c) La mélanogenèse

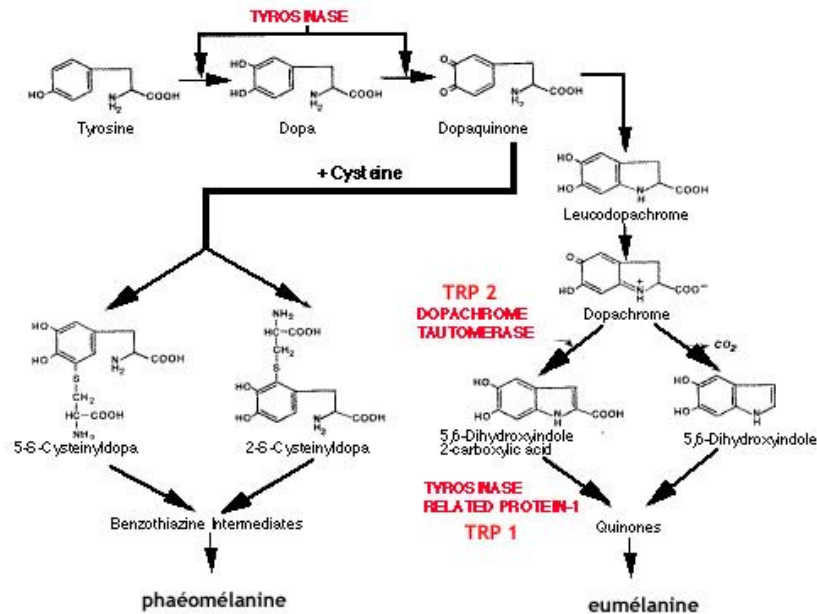
Il existe deux types de mélanines, les eumélanines (brunes à noires) et les phaéomélanines (jaunes orangées), qui sont synthétisées à partir d'un même précurseur, la tyrosine (Figure 11). L'enzyme clef de la chaîne de biosynthèse des mélanines est la tyrosinase. Cette enzyme a la particularité de catalyser trois réactions de la chaîne de biosynthèse des eumélanines :

- l'hydroxylation de la tyrosine en 3, 4 dihydroxyphénylalanine (DOPA),
- l'oxydation de la DOPA en DOPAquinone,
- l'oxydation du 5, 6-dihydroxyindole (DHI) en indole quinone.

Les eumélanines dérivent des métabolites du DOPAchrome grâce à l'intervention de deux autres enzymes clefs : la DOPAchrome tautomérase (DCT ou TYRP2 = *tyrosinase related protein 2*) et la tyrosinase *related protein 1* (TYRP1). Les phaéomélanines proviennent quant à elles des métabolites de la cystéinyldOPA. Les types intermédiaires de mélanines proviennent du mélange entre eu- et phaéomélanines en différentes proportions.

Il semblerait qu'il y ait certaines différences entre la tyrosinase des mélanocytes cutanés et celle des mélanocytes de l'oreille interne. Certaines études parlent plutôt, dans l'oreille interne, d'une tyrosine hydroxylase dont la structure et la cinétique serait différente de la tyrosinase de la peau (BENEDITO *et al.*, 1997).

Figure 11: Les étapes de la mélanogénèse
(d'après ALHAIDARI *et al.*, 1999)



Légende : La mélanogénèse permet d'aboutir à la synthèse de deux types de pigments (la phaéomélanine et l'eumélanine) après une suite de réactions enzymatiques

La mélanogénèse se produit exclusivement dans les mélanosomes. Bien qu'elle puisse être fonctionnelle dès sa synthèse dans le RE (Réticulum Endoplasmique), le Golgi et les vésicules golgiennes, la tyrosinase est inactive jusqu'à son incorporation dans la paroi du mélanosome.

Selon qu'ils contiennent de l'eu- ou de la phaéomélanine, les mélanosomes ne possèdent pas la même structure en microscopie électronique.

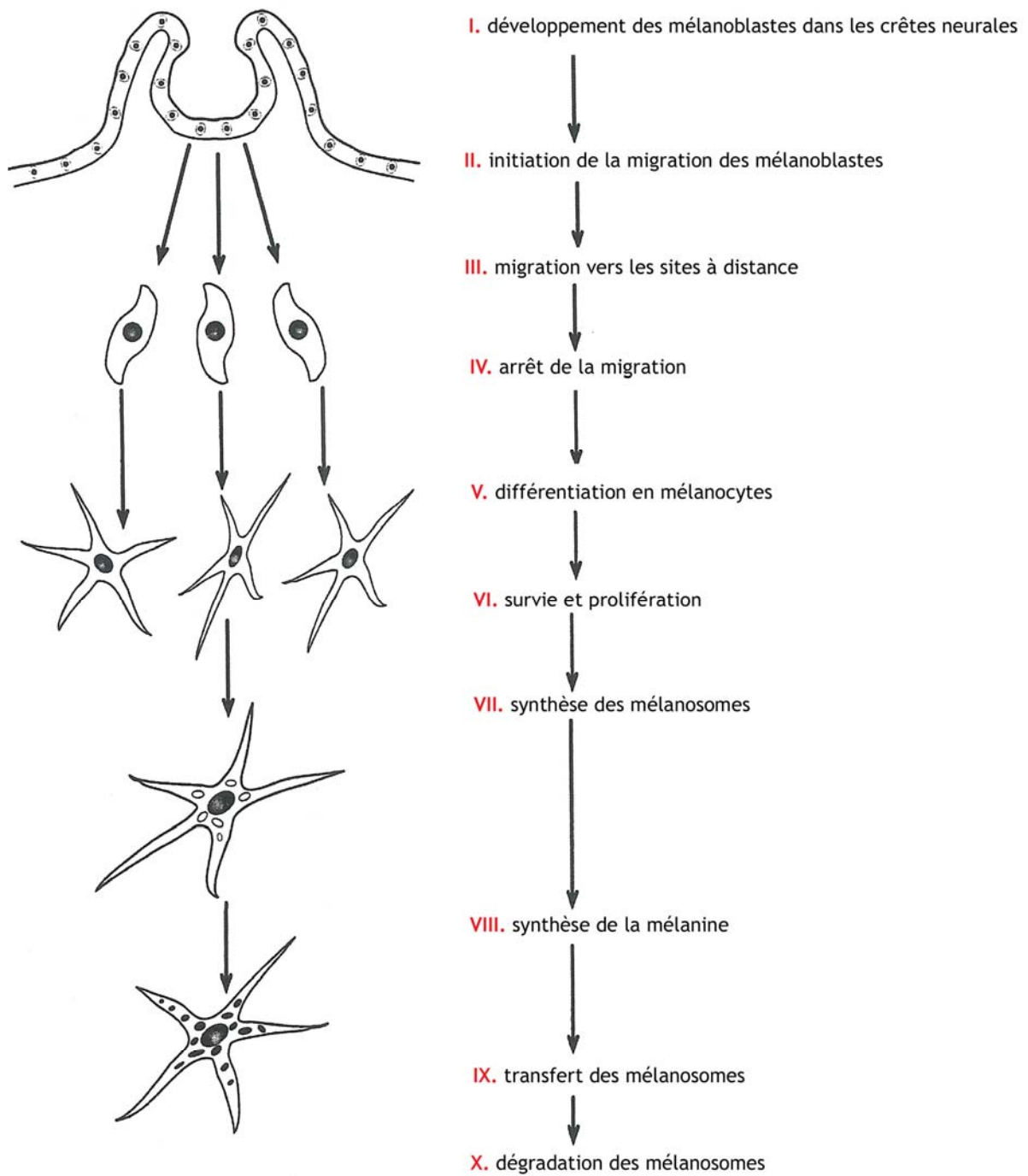
Les phaéomélanosomes ont une matrice non organisée ; le pigment est déposé au hasard sur un enchevêtrement de fibres. Dans les eumélanosomes, les fibres sont parallèles ; l'eumélanine est déposée de façon organisée sur la matrice. On peut rencontrer dans certaines conditions des eu- et des phaéomélanosomes dans un même mélanocyte, mais généralement, les mélanosomes sont spécialisés dans la production d'un seul type de mélanine.

2.Aperçu général sur la régulation génétique de la mélanocyto-genèse (DJIAN-ZAOUCHE, 2008)

La mélanocyto-genèse est donc une suite d'étapes complexes qui commence très tôt dans le développement embryonnaire et qui fait intervenir de nombreux gènes (ALHAIDARI *et al.*, 1999) (Figure 12). La particularité de cette fonction est qu'elle peut être complètement modifiée et altérée sans pour autant provoquer la mort de l'individu. Plusieurs lignées de souris présentant différents troubles de la pigmentation ont donc pu être sélectionnées et ont permis le clonage de nombreux gènes intervenant dans la mélanogenèse de la Souris et de l'Homme. Dans le tableau 4, les principaux gènes gouvernant cette fonction sont cités et classés selon le moment où ils interviennent. Les noms des mutations et des maladies qu'ils entraînent chez l'Homme, lorsqu'ils sont mutés, sont également précisés.

Figure 12 : Les étapes de la mélanocytogenèse

(Modifié d'après ALHAIDARI *et al.*, 1999)



Légende : Chaque étape est associée à l'aspect morphologique schématisé des mélanoblastes ou mélanocytes.

Tableau 4 : Principaux gènes intervenant dans la mélanocytogenèse et noms des mutations de ces gènes connues chez l'Homme (BENNETT et LAMOREUX, 2003)

Symbol (old symbol)	Name (old name)	Chromosome	Function	Human symbol	Human chr'some	Syndrome
(a) Melanocyte development						
<i>Adam17</i>	A disintegrin and metalloprotease domain 17	12	Protease, processing various bioactive proteins	<i>ADAM17</i>	2p25	N
<i>Adamts20 (bt)</i>	A disintegrin and metalloprotease domain (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20 (belted)	15	Metalloprotease. Melanoblast migration?	<i>ADAMTS20</i>	12q12	N
<i>Brcal</i>	Breast cancer 1	11	Development of various organs; tumor suppressor	<i>BRCA1</i>	17q21	BC
<i>Eda (Ta)</i>	Ectodysplasin-A (tabby)	X	Sweat gland, tooth and hair morphogenesis	<i>ED1</i>	Xq12-q13	EDA/HED
<i>Edn3 (ls)</i>	Endothelin 3 (lethal spotting)	2	Growth and differentiation factor	<i>EDN3</i>	20q13	HD, WSS
<i>Ednrb (s)</i>	Endothelin receptor type B (piebald spotting)	14	Growth factor receptor	<i>EDNRB</i>	13q22	HD, WSS
<i>Egfr (Dsk5)</i>	Epidermal growth factor receptor (dark skin 5)	11	Growth factor receptor	<i>EGFR</i>	7p12.3	N
<i>Fgfr2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	7	Growth factor receptor	<i>FGFR2</i>	10q26	CrS, PIS
<i>Ikbkg</i>	Inhibitor of κ B kinase, γ subunit (NEMO)	X	I κ B kinase. Required for NF κ B signaling	<i>IKBKG</i>	Xq28	IP, HED-ID, EDA-ID
<i>Klt (W)</i>	Kit oncogene (white spotting)	5	Growth factor receptor	<i>KIT</i>	4q11-q12	PS
<i>Kitl (Sl)</i>	Kit ligand (steel)	10	Growth and differentiation factor	<i>KITLG</i>	12q22	N
<i>Krt2-17 (Dsk2)</i>	Keratin 2-17 (dark skin 2)	15	Cytoskeleton	<i>KRT2A</i>	12q11-q13	IBS
<i>Lmx1a (dr)</i>	LIM homeobox transcription factor 1 α (dreher)	1	Transcription factor	<i>LMX1A</i>	1q22-23	N
<i>Mcoln3 (Va)</i>	Mucolipin 3 (varitint-waddler)	3	Cation channel	<i>MCOLN3</i>	1p22.3	N
<i>Mitf (mi)</i>	Microphthalmia-associated transcription factor (microphthalmia)	6	Transcription factor	<i>MITF</i>	3p12-14	WS2
<i>Pax3 (Sp)</i>	Paired box gene 3 (splotch)	1	Transcription factor	<i>PAX3</i>	2q35	WS1, WS3
<i>Sfn1 (f)</i>	Sideroflexin 1 (flexed tail)	13	Tricarboxylate carrier	<i>SFXN1</i>	5q35.3	N
<i>Snai2</i>	Snail homolog 2/Slug	16	Transcription factor	<i>SNAI2</i>	8q11	WS2
<i>Sox10 (Dom)</i>	SRY-box containing gene 10 (dominant megacolon)	15	Transcription factor	<i>SOX10</i>	22q13.1	WSS
<i>Sox18 (rg, Dcc1)</i>	SRY-box containing gene 18 (ragged, dark coat color 1)	2	Transcription factor	<i>SOX18</i>	20q13.33	N
<i>Wnt1</i>	Wingless-related MMTV integration site 1	15	Growth factor/morphogen	<i>WNT1</i>	12q13	N
<i>Wnt3a</i>	Wingless-related MMTV integration site 3A	11	Growth factor/morphogen	<i>WNT3A</i>	1q42	N
(b) Components of melanosomes and their precursors						
<i>Dct (slt)</i>	Dopachrome tautomerase (slt)	14	Melanosomal enzyme	<i>DCT</i>	13q31-q32	N
<i>Gpnmb</i>	Glycoprotein (transmembrane) NMB	6	Apparent melanosomal component	<i>GPNNMB</i>	7p15	N
<i>Matp (uw)</i>	Membrane-associated transporter protein (underwhite)	15	Apparent transporter	<i>MATP</i>	5p	OCA4
<i>Rab38 (cht)</i>	RAB38, member RAS oncogene family (chocolate)	7	Targeting of Tyrp1	<i>RAB38</i>	11q14	N
<i>Sl (sl)</i>	Silver (silver)	10	Melanosome matrix	<i>SILV</i>	12q13-q14	N
<i>Tyr (c)</i>	Tyrosinase (color, albino)	7	Melanosomal enzyme	<i>TYR</i>	11q21	OCA1
<i>Tyrrp1 (b)</i>	Tyrosinase-related protein 1 (brown)	4	Melanosomal protein	<i>TYRP1</i>	9p23	OCA3
(c) Melanosome construction/protein routing (HPS-related)						
<i>Ap3b1 (pe)</i>	Adaptor-related protein complex AP-3, β 1 subunit (pearl)	13	Organelle protein routing	<i>AP3B1</i> [HPS2]	15q15	HPS
<i>Ap3d (mh)</i>	Adaptor-related protein complex AP-3, δ subunit (mocha)	10	Organelle protein routing	<i>AP3D1</i>	19p13.3	N
<i>Vps33a (bf)</i>	Vacuolar protein sorting 33a (buff)	5	Organelle protein routing	<i>VPS33A</i>	12q24.31	N
<i>cno (eno)</i>	Cappuccino	5	Organelle biogenesis	<i>CNO</i>	4p16-p15	N
<i>Hps1 (ep)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (pale ear)	19	Organelle biogenesis and size	<i>HPS1</i>	10q24	HPS
<i>Hps3 (coa)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 3 homolog (cocoa)	3	Organelle biogenesis	<i>HPS3</i>	3q24	HPS
<i>Hps4 (le)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog (light ear)	5	Organelle biogenesis and size	<i>HPS4</i>	22q11-q12	HPS
<i>Hps5 (ru2)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 5 homolog (ruby-eye 2)	7	Organelle biogenesis	<i>HPS5</i>	11p14	HPS
<i>Hps6 (ru)</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 6 homolog (ruby-eye)	19	Organelle biogenesis	<i>HPS6</i>	10q24.31	HPS
<i>Lyst (bg)</i>	Lysosomal trafficking regulator (beige)	13	Organelle biogenesis and size	<i>LYST</i>	1q42	CHS
<i>Muted (mu)</i>	Muted (muted)	13	Organelle biogenesis	<i>MU</i>	6p25-p24	N
<i>Oal</i>	Mouse homolog of human ocular albinism 1 (Nettleship-Falls)	X	Melanosome biogenesis and size	<i>OAI</i>	Xp22.3	OA
<i>p</i>	Pink-eyed dilution	7	?Glutathione transport in ER. Melanosomal protein processing and routing.	<i>P</i>	15q11-q12	OCA2
<i>Pldn (pa)</i>	Pallidin (pallid)	2	Organelle biogenesis	<i>PLDN</i>	15q15.1	N
<i>Rabgta (gm)</i>	Rab geranylgeranyl transferase, α subunit (gunmetal)	14	Organelle biogenesis	<i>RABGTA</i>	14q11.2	Ch
(d) Melanosome transport						
<i>Mlph (ln)</i>	Melanophilin (leadon)	1	Melanosome transport	<i>MLPH</i>	2q37	N
<i>Myo5a (d)</i>	Myosin Va (dilute)	9	Melanosome transport	<i>MYO5A</i>	15q21	GS
<i>Myo7a (sh-1)</i>	Myosin VIIa (shaker-1)	7	Melanosome transport (pigmented retina)	<i>MYO7A</i>	11q13.5	US 1B
<i>Rab27a (ash)</i>	RAB27A, member RAS oncogene family (ashen)	9	Melanosome transport	<i>RAB27A</i>	15q15-q21	GS
(e) Eumelanin and pheomelanin						
<i>a</i>	Non-agouti	2	Eumelanin/pheomelanin switch	<i>ASIP</i>	20q11.2	N
<i>Attn (mg)</i>	Attractin (mahogany)	2	Eumelanin/pheomelanin switch (among others)	<i>ATRN</i>	20p13	N
<i>Ggt1</i>	γ Glutamyltranspeptidase 1	10	Glutathione metabolism (pheomelanin synthesis)	<i>GGT loci (several)</i>	22q11	GU
<i>Gl</i>	Grey-lethal	10	Pheomelanin and osteoclast function	<i>GL</i>	6q21	SRO
<i>Mclr (e)</i>	Melanocortin 1 receptor (extension)	8	Eumelanin/pheomelanin switch (among others)	<i>MC1R</i>	16q24.3	RH
<i>Mgrn1 (md)</i>	Mahogunin, ring finger 1 (mahoganoid)	16	Melanin color, CNS role. E3 ubiquitin ligase	<i>MGRN1</i>	16p13.3	N
<i>Pomc1</i>	Pro-opiomelanocortin- α	12	Eumelanin/pheomelanin (and endocrine)	<i>POMC</i>	2p23.3	O and RH
(f) Systemic effects						
<i>Atp7a (Mo)</i>	ATPase, Cu ²⁺ transporting, α polypeptide (mottled)	X	Copper transport	<i>ATP7A</i>	Xq13.2-q13.3	MD
<i>Atp7b (tx)</i>	ATPase, Cu ²⁺ transporting, β polypeptide (toxic milk)	8	Copper transport	<i>ATP7B</i>	13q14-q21	WD
<i>Bcl2</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2	1	Inhibitor of apoptosis	<i>BCL2</i>	18q21.3	BCL
<i>Ercc2</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	7	DNA excision repair	<i>ERCC2</i>	19q13	XPD, TTD, CS

See refs (2, 5) for more information on any locus.

N: none known, BC: breast cancer, BCL: B-cell lymphoma, Ch: choroideremia, CHS: Chediak-Higashi syndrome, CS: Cockayne syndrome, CrS: Crouzon syndrome, EDA: ectodermal dysplasia, anhidrotic, EDA-ID: EDA with immune deficiency, GS: Griscelli syndrome, GU: Glutathionuria, HED: hypohidrotic ectodermal dysplasia, HED-ID: HED with immune deficiency, HPS: Hermansky-Pudlak syndrome, HD: Hirschsprung disease, HSS: Hirschsprung-Shah syndrome, IBS: ichthyosis bullosa of Siemens, IP: incontinentia pigmenti, MD: Menke's disease, O: obesity, OA: ocular albinism, OCA1-4: oculocutaneous albinism types 1-4, PIS: Pfeiffer syndrome, PS: piebald syndrome, RH: red hair (included although not a defect), SRO: severe recessive osteopetrosis, TTD: trichothiodystrophy, US 1B: Usher syndrome, type 1B, WD: Wilson disease, WS1-3: Waardenburg syndrome types 1-3, WSS: Waardenburg-Shah syndrome (Waardenburg syndrome type 4), XPD: xeroderma pigmentosum, group D.

Lors de l'embryogenèse et en période post-natale, les mélanoblastes expriment une série de gènes de développement. Ces gènes appartiennent à deux catégories : des gènes codant des facteurs de transcription et des gènes intervenant dans des voies de signalisation impliquées dans une communication inter-cellulaire. Ils peuvent intervenir dans la survie des cellules du lignage mélanocytaire et /ou une ou plusieurs étapes de leur développement : leur détermination, leur migration, leur prolifération, la colonisation des différents tissus cibles, et enfin leur différenciation en mélanocytes.

Les principaux sont les gènes codant les facteurs de transcription *MITF* (*Microphthalmia-associated transcription factor*), *PAX3* (*paired box gene 3*) et *SOX10* (*SRY-box containing gene 10*) ainsi que des gènes intervenant dans les voies de signalisation du récepteur à activité tyrosine-kinase *KIT* et celle du récepteur EDRNB (endothelin receptor type B). Ces gènes sont exprimés séquentiellement par les mélanoblastes au cours de leur différenciation.

Le gène *MITF* sera étudié dans la partie C.

Le gène *PAX3* appartient à la famille des gènes *PAX* qui comportent 9 membres chez la Souris, et sont hautement conservés. Cette famille code des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN, le domaine *paired*. Certaines protéines *PAX* dont la protéine *PAX3*, possèdent un autre domaine de liaison à l'ADN, l'homéodomaine. Ce domaine permet la reconnaissance de la séquence palindromique 5'-TAAT(N)₂₋₃ATTA-3' par les protéines dimérisées. Entre le domaine *paired* et l'homéodomaine, un domaine composé de huit acides aminés a été identifié sur toutes les protéines *PAX*, excepté *PAX4* et *PAX6*. Des délétions de cet octapeptide suggèrent que ce domaine est impliqué dans une activité d'inhibition de la transcription, alors que la partie carboxy-terminale des protéines *PAX* serait un domaine d'activation de la transcription.

Les fonctions cellulaires de *PAX3* dans le développement du lignage mélanocytaire sont à ce jour peu documentées. Des études portant sur des mutants de Souris *Pax3* ont montré que *PAX3* est requis pour la migration et la prolifération des mélanoblastes, ainsi que pour leur différenciation en mélanocytes.

SOX10 appartient à la famille des gènes *SOX*. Les protéines *SOX* sont des facteurs de transcription caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN homologue au domaine HMG (*High Mobility Group*) du gène *SRY* qui détermine le sexe chez les Mammifères. A ce jour, vingt protéines *SOX* ont été identifiées chez les Mammifères, elles sont largement exprimées durant l'embryogenèse. Les protéines *SOX* ont été classées dans différents groupes en fonction des acides aminés de leur domaine HMG. La protéine *SOX10* fait partie du sous-groupe E avec les protéines *SOX8* et *SOX9*. Les protéines *SOX* possèdent une capacité très forte à se lier à l'ADN. Elles sont impliquées dans l'architecture de la conformation tridimensionnelle du complexe ADN-multiprotéines sur les promoteurs et les séquences régulatrices, conduisant ainsi à la transcription des gènes. Les protéines *SOX* sont impliquées dans de nombreux processus du développement, dont la détermination sexuelle et le développement des crêtes neurales. Elles interviennent dans le devenir des cellules au cours du développement. Les protéines *SOX* sont largement exprimées lors de l'embryogenèse. Chez l'adulte, elles sont exprimées dans une large variété de tissus et de types

cellulaires et chacun des gènes codant les protéines SOX a un profil d'expression précis. Au cours du développement, *SOX10* est exprimé dans les ganglions sympathiques dorsaux et craniaux, dans les ganglions entériques, ainsi que dans les cellules localisées dans la voie de migration dorso-latérale empruntées par les mélanoblastes en migration. Toujours à l'aide de mutants de souris, il a été montré que *SOX10* interviendrait dans la survie précoce et la détermination tardive des mélanoblastes.

La voie de signalisation KIT/KITL est impliquée dans la migration, la prolifération et/ou la survie de quatre types cellulaires différents : les mélanoblastes issus des crêtes neurales, les cellules hématopoïétiques dont les érythrocytes et les mastocytes, les cellules germinales et les cellules interstitielles de Cajal. C'est grâce au phénotype des mutants *Kit* et *Kitl* chez la souris que certains rôles de cette voie de signalisation ont été découverts pour ces quatre types cellulaires. Le proto-oncogène *KIT* code un récepteur trans-membranaire appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le gène *KITL* code le ligand de la protéine KIT, appelée KITL, MGF (*Mast cell Growth Factor*) ou SCF (*Stem Cell factor*). La protéine KITL existe sous forme soluble ou associée à la membrane plasmique des cellules. Le mécanisme de transduction du signal par le couple KIT/KITL est analogue à celui des autres récepteurs à activité tyrosine-kinase. Durant l'embryogenèse, la migration et la localisation des précurseurs des mélanoblastes sont guidés par la voie de signalisation KIT/KITL. En l'absence des protéines KIT ou KITL fonctionnelles (étude de mutants nuls *Kit* de Souris), les précurseurs des mélanocytes semblent stopper leur migration et disparaissent peu de temps après. La voie de signalisation KIT/KITL est donc impliquée premièrement dans la migration des précurseurs des mélanocytes, puis dans leur survie. Le rôle du couple KIT/KITL dans la prolifération des mélanoblastes a été suggérée par des études *in vivo* et *in vitro* : les mélanoblastes présentant une activité réduite du récepteur KIT prolifèrent moins vite que les mélanoblastes sauvages. De plus, des études sur des souris exprimant KITL de façon constitutive et ectopique dans l'épiderme ont montré que KITL stimulait la migration et la prolifération des mélanoblastes. Ainsi le couple KIT/KITL est indispensable à la survie, à la migration et à la prolifération des mélanoblastes lors de l'embryogenèse.

Les endothélines appartiennent à une famille de peptides de 21 acides aminés composée de trois membres. Elles ont une activité vasoconstrictrice. Chez la Souris, les trois endothélines sont codées par les gènes *Edn1*, *Edn2* et *Edn3* (endothélines 1, 2 et 3). Chacun de ces gènes codent une pré-pro-endothéline qui est convertie en endothéline par protéolyse. Les précurseurs des endothélines sont clivés par deux protéases pour produire les endothélines matures et actives. Les pré-pro-endothélines sont clivées par des endopeptidases pour former des intermédiaires biologiquement inactifs appelés grosses-endothélines. Les grosses-endothélines sont ensuite clivées par des enzymes de conversion de l'endothéline : en anglais *Endothelin Enzyme Convertase* (ECE) pour donner la forme active de l'endothéline. Il existe deux protéines de type ECE : ECE-1 et ECE-2. Les endothélines actives se lient à deux récepteurs distincts : EDNRA (Récepteur de type A de l'endothéline) et EDNRB (Récepteur de type B à l'endothéline) qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs sont codés respectivement par les gènes *Ednra* et *Ednrb* chez la Souris. La protéine EDNRB

peut lier EDN1, EDN2 et EDN3 avec une même affinité, alors que la protéine EDNRA lie préférentiellement EDN1 et EDN2.

Le couple EDN1/EDNRA est essentiel au développement des tissus céphaliques dérivés des cellules des crêtes neurales chez la Souris. Au contraire, le couple EDN3/EDNRB est essentiel au développement des mélanocytes et des neurones entériques. Plus précisément, il a été montré, chez la Souris, que la voie EDN3/EDNRB était nécessaire à la migration des mélanoblastes.

C. Le facteur de transcription MITF : protéine intégratrice clé dans la cascade régulatrice de la pigmentation (WIDLUND et FISHER, 2003)

1. Structure, expression, régulation et fonction de MITF

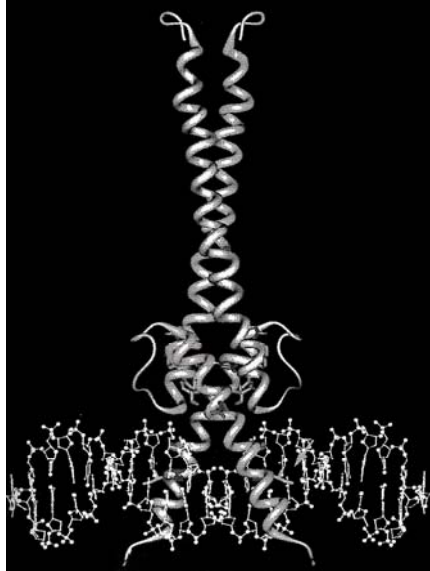
a) Structure et expression de MITF

Historiquement l'étude de ce gène a été réalisée chez la Souris à partir des mutants microphthalmia qui lui ont donné son nom : *Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf)*.

Chez l'Homme, le gène *MITF* est localisé en 3p12.3-p14.1 et s'étend sur 230 kilobases (kb). Il inclut 13 exons différenciellement utilisés selon les transcrits obtenus. A ce jour, 5 promoteurs alternatifs ont été décrits induisant la production de 9 isoformes différentes (NC_000003.10, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). Cette organisation est conservée chez la Souris et le Chien, chez lequel *Mitf* couvre une longueur de 190 kb sur le chromosome 20 (TSUCHIDA *et al.* 2008).

Dans le cadre de notre étude, seule l'isoforme *MITF-M*, initialement décrite dans les mélanocytes, nous a intéressé. Le transcrit *MITF-M* est long de 4500 paires de bases (pb). Il est produit en réponse à l'activation du promoteur M qui permet la transcription des 9 exons les plus en 3' du gène. Il semble exprimé exclusivement dans les mélanocytes dérivés des crêtes neurales. Les sites majeurs d'expression décrits chez le Chien, en dehors de la peau, sont le tube digestif, le rein, la rétine et le système nerveux central (TSUCHIDA *et al.* 2008). *MITF-M* code pour une protéine de 419 acides aminés (aa). Elle possède un motif particulier appelé « *hélice-boucle-hélice basique* », bHLH-Zip capable de se dimériser puis de se fixer sur une séquence d'ADN de type *E Box* (CATGTG) qui représente le cœur de la M-box (AGTCATGTGCT) où se fixe spécifiquement *MITF* (Figure 13).

Figure 13 : Structure de la protéine MITF codée par le gène *MITF-M* (d'après STEINGRIMSSON *et al.*, 1994)



Légende : Modèle tri-dimensionnel du domaine bHLH-Zip de la protéine MITF dimérisé et fixé sur *MITF-M*

b) Régulation de l'expression MITF (DJIAN-ZAOUCHE, 2008) (Figure 14)

- SOX10, en combinaison avec PAX3, régule l'expression de *MITF*

Chez l'Homme, il a été montré que deux mutations, l'une dans *MITF* l'autre dans *PAX3*, induisait deux syndromes très proches appelés respectivement syndrome de Waardenburg de type 2 et 1 (WS 2 et 1). Cette constatation a suggéré une interaction possible entre *MITF* et *PAX3* (HORNYAK *et al.* 2001). Des expériences de transfection sur cellules humaines ont permis de préciser ces interactions. SOX10 est capable de se lier au promoteur de *MITF* et se comporte comme un activateur fort de l'expression de *MITF*. Une forme mutée de la protéine SOX10 réprime de façon dominante négative l'expression de *MITF*. D'autres expériences de transfection ont montré que l'activation de l'expression de *MITF* par SOX10 était stimulée par *PAX3*. Cette transactivation était directe : le promoteur de *MITF* comporte plusieurs sites de fixation pour SOX10.

Le promoteur de *MITF* comporte également un site de liaison à *PAX3*. Deux études indépendantes sur la lignée des cellules cancéreuses ont montré la synergie entre *PAX3* et SOX10 pour réguler l'expression de *MITF*. Cette synergie a également été observée pour une lignée de fibroblastes. En résumé, les facteurs de transcription SOX10 et *PAX3* jouent un rôle clé dans l'établissement de l'expression de *MITF* dans les cellules du lignage mélanocytaire.

- Interactions entre *KIT* et *MITF*

Chez la Souris, il a été montré que *Kit* et *Mitf* interagissaient génétiquement. Des cultures de crêtes neurales de souris ont permis de montrer que l'initiation de l'expression du gène *Mitf* était indépendante de KIT mais que la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes était dépendante de KIT. De plus, le promoteur du gène *Kit* contient une M-box (boîte M) et l'expression de *Kit* peut être induite par MITF via la boîte M. Dans les mélanoblastes, MITF est requis pour augmenter l'expression de *Kit* mais pas pour l'initier.

De plus, dans les mélanocytes normaux et issus de mélanomes en culture, la voie de signalisation KIT/KITL conduit à une augmentation de la phosphorylation de MITF. Une fois phosphorylé MITF s'associe au co-activateur transcriptionnel p300 pour activer la transcription de gènes cibles. D'autres expériences ont montré que la phosphorylation de MITF entraînait sa dégradation.

KIT et MITF ont donc des interactions très complexes. MITF semble nécessaire pour le maintien de l'expression de *Kit* dans les mélanoblastes. La voie de signalisation KIT/KITL semble quant à elle moduler l'activité et la stabilité de MITF dans les mélanocytes en culture.

- Régulation de l'expression de *MITF* par le signal *WNT*/βcatenin (GODING, 2000)

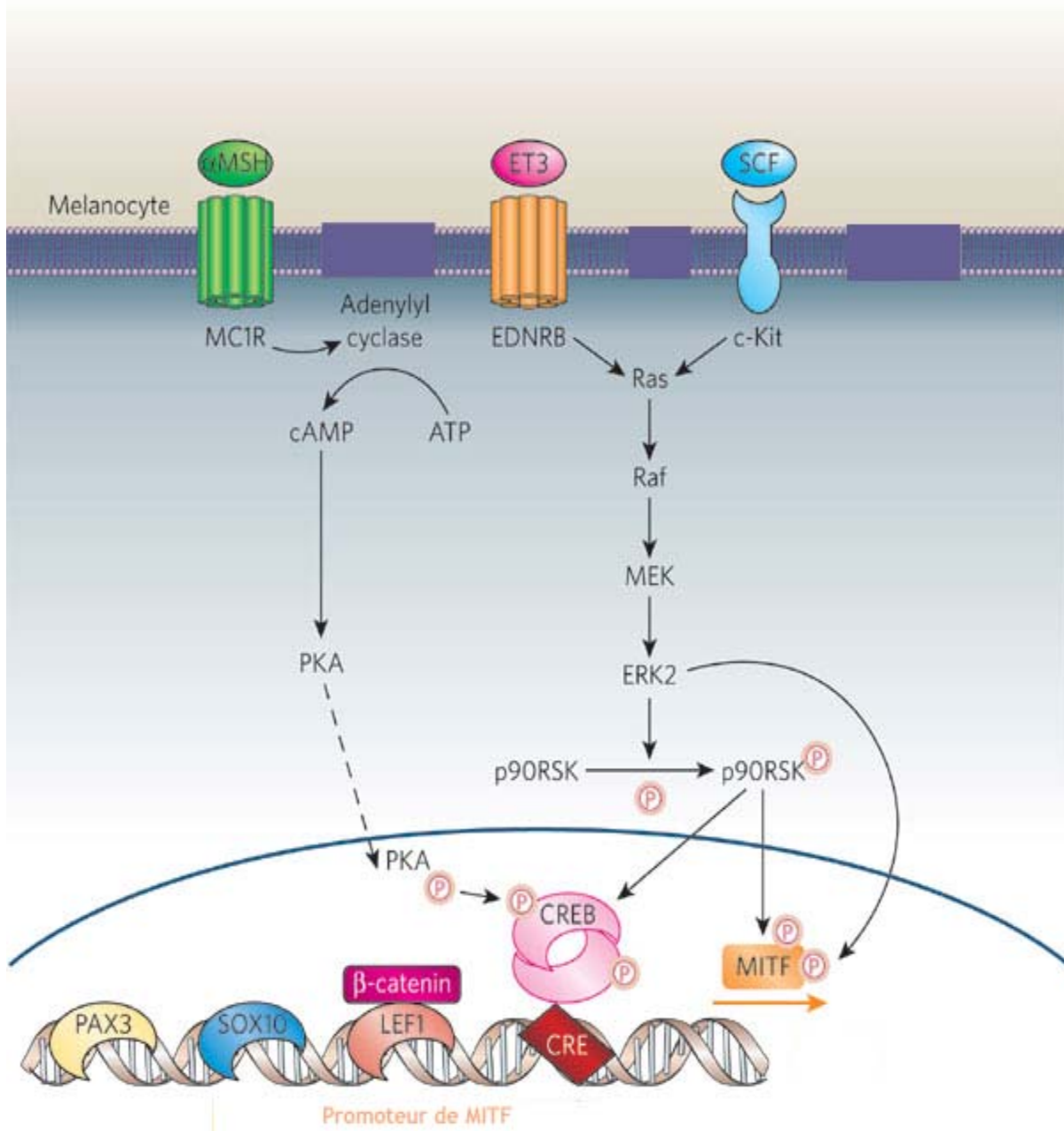
Il a été montré que la protéine WNT pouvait réguler l'expression de MITF. La présence d'un signal *Wnt* entraîne une augmentation de la concentration en β-caténine dans la cellule. La β-caténine est transloquée vers le noyau où elle forme un complexe avec les membres de la famille de facteurs de transcription *LEF* (*Lymphoid Enhancer Factor*). Comme *Sox10*, les protéines de la famille Lef appartiennent à un groupe de protéine de régulation possédant une boîte de type *High Mobility Group*. La présence de *Lef1* seul, sans expression de *WNT* et donc sans β-caténine a un effet répressif de *MITF* tandis que le complexe β-caténines/Lef1 augmente son expression. L'expression de *WNT* aurait donc un rôle de dé-répression sur *LEF1*.

- Régulation de l'expression de *MITF* par l'AMPc (BERTOLOTTO *et al.*, 1998)

Dans le mélanocyte, la fixation de l'αMSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) sur son récepteur MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) induit l'élévation d'un second messager : l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique ou AMP cyclique).

L'isolement du promoteur de *MITF* a révélé la présence d'un élément de réponse à l'AMPc appelé CRE (*cAMP Response Element*). Une étude a révélé qu'une élévation du niveau d'AMPc entraînait l'augmentation de la concentration cellulaire en MITF. L'action de l'AMPc serait indirecte, elle entraînerait une cascade de phosphorylations avec en bout de chaîne la phosphorylation de CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) qui pourrait alors se fixer sur CRE et stimuler l'expression de *MITF*.

Figure 14 : Le promoteur de *MITF* (d'après LIN et FISHER, 2007)



Légende :

αMSH : Melanocyte Stimulating Hormon
 MC1R : Melanocortin 1 Receptor
 cAMP : Adenosin Monophosphate Cyclic
 ATP : Adenosin Tri Phosphate
 PKA : Protein Kinase
 CREB : cAMP Reponsive Element Binding Protein
 CRE : cAMP Responsive Element
 ET3 : Endothelin 3
 p90RSK : Ribosomal Protein S6 Kinase Polypeptide 2

EDNRB : Endothelin Receptor Type B
 MEK : Midkine
 ERK2 : Mitogen Activated Protein Kinase 1
 SCF = KITL : Kit Ligant
 MITF : Microphthalmia Transcription Factor
 PAX3 : Paired Box Gene 3
 SOX10 : SYR Box Containing Gene 10
 LEF1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
 c-Kit : Kit Oncogene

Ce schéma précise l'ensemble des facteurs intervenant dans la régulation de l'expression de MITF. Ils agissent soit de manière directe en se fixant sur le promoteur de MITF, soit en entraînant une cascade de phosphorylations qui activent MITF directement ou d'autres facteurs de transcription

c) Fonctions de MITF

- MITF régule l'expression des gènes codant pour les trois enzymes principales de la mélanogenèse

La différenciation terminale en mélanocytes est associée à l'activation de la transcription des gènes de la famille tyrosinase, responsables de la synthèse des pigments. MITF, PAX3 et SOX10, seuls ou en interactions, régulent l'expression des gènes impliqués dans la mélanogenèse.

MITF est un facteur clé pour initier la transcription de plusieurs gènes spécifiques du lignage mélanocytaire. Pour cette raison, il a été qualifié de gène sélecteur du lignage mélanocytaire. Les promoteurs des gènes *TYR*, *TYRP* et *DCT* comportent tous trois des sites de liaison E-box, sur lesquelles MITF peut se lier. Le gène *TYR* comporte, outre les deux sites de liaison localisés dans la séquence promotrice, un élément plus distant, *Tyrosinase Distal Element* (TDE). Localisé en amont du gène, le TDE comporte un troisième site de liaison à MITF.

Des analyses de promoteur du *DCT* ont mis en évidence que ce gène possède des sites de liaison pour MITF, PAX3 et SOX10.

L'expression de *TYRP1* dans les mélanocytes de la peau est contrôlée par MITF. En effet, le promoteur de *TYRP1* comporte plusieurs sites de liaison à différents facteurs de transcription incluant MITF.

- PAX3 et MITF régulent la balance entre le maintien des cellules souches et la différenciation en mélanocytes

Le facteur de transcription PAX3 joue un rôle important dans le maintien des cellules souches des mélanocytes. Il a été montré que PAX3 était exprimé dans les cellules souches des mélanocytes. Des études de transfection dans la lignée cellulaire humaine de rein 293T ont montré que SOX10 et MITF activaient de façon synergique l'enhancer de *DCT*. Des sites de liaison pour MITF, PAX3 et SOX sont présents dans l'enhancer de *Dct* et des expériences de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*), ont déterminé que les trois facteurs de transcription sont capables de se lier effectivement à cet enhancer. D'autres expériences de ChIP ont été réalisées en faisant varier le ratio des protéines PAX3 et MITF. Quand les deux protéines sont en concentration égales, PAX3 a une plus grande affinité pour l'enhancer de *DCT* que MITF. PAX3 est délogé de cet enhancer lorsque la concentration de MITF est supérieure à celle de PAX3. PAX3 semble alors agir comme un inhibiteur compétitif de MITF pour sa liaison à l'enhancer de *DCT* dont il réprime l'expression.

Il a été montré chez la Souris que le complexe que forme la β -caténine avec ses co-facteurs de transcription Tcf. Lef (*T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*) et le co-répresseur Groucho, était impliqué dans la compétition entre PAX3 et MITF pour la liaison à l'enhancer de *Dct*. Un site de liaison pour le facteur de transcription Tcf/Lef est localisé de façon adjacente au site de liaison à MITF. Il a été proposé que le modèle d'action de PAX3 serait le suivant : alors que PAX3 et SOX10 activent l'expression de *MITF*, de façon simultanée, PAX3 empêche MITF d'activer *DCT*. Ainsi, la protéine MITF s'accumule et active ainsi *DCT* dès que sa répression médiée par PAX3 est levée par la β -caténine activée (β -caténine activée par la voie *Wnt*).

Enfin, on peut ajouter que MITF contrôle l'expression de gènes non directement impliqués dans la mélanogenèse. Ces gènes appartiennent au groupe des régulateurs

du cycle cellulaire ou de l'apoptose. L'activation de la voie MITF par des oncogènes est par exemple proposée comme mécanisme de prolifération et de survie des cellules de mélanome (WELLBROCK *et al.*, 2008).

2. Les allèles du gène *Mitf* chez la Souris et du gène *MITF* chez l'Homme et leurs répercussions phénotypiques

Les premières études cherchant à mettre en évidence les mutations de ce gène et leurs conséquences ont été menées chez la Souris. Treize mutations spontanées du gène ont été identifiées à ce jour.

La dissection de chacune de ces mutations a permis de montrer que 6 d'entre elles étaient contenues dans les différents motifs bHLH-LZ, mettant en évidence l'importance fonctionnelle de ces motifs (STEINGRIMSSON *et al.*, 1994). L'ensemble des mutations est présenté dans le tableau 5.

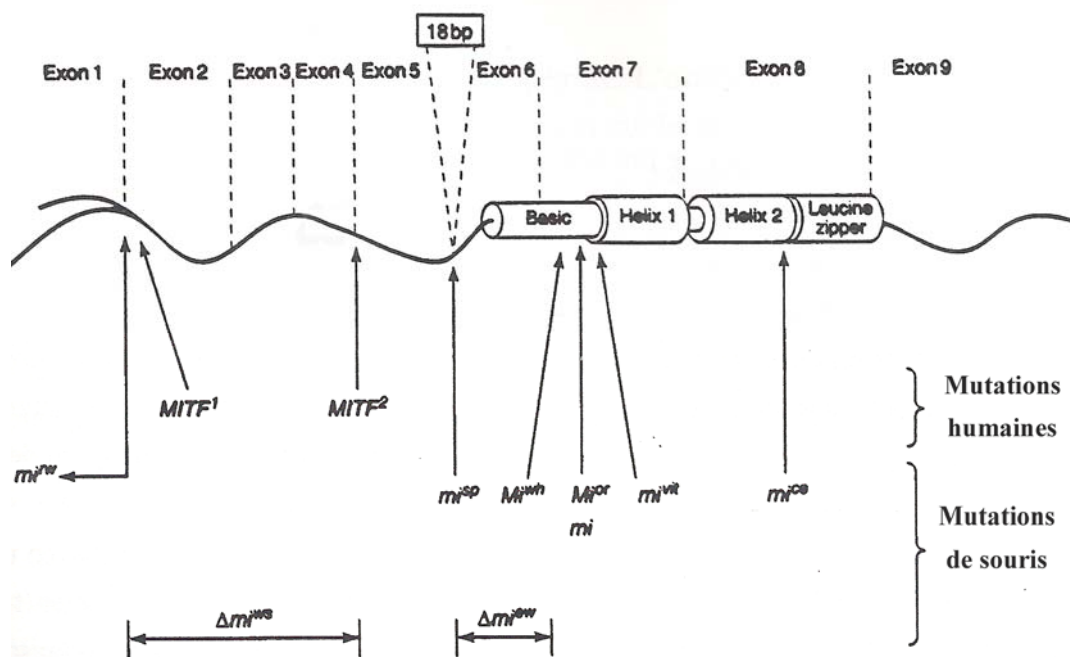
Tableau 5 : Les Mutations du gène MITF chez la Souris et leurs conséquences phénotypiques (d'après www.informatics.jax.org)

Symbole de l'allèle Nom de l'allèle	Synonymes	Mécanisme d'induction de la mutation	Systèmes anatomiques et/ou physiologiques affectés suite à la mutation
Mitf ^{mi-b} microphthalmia brownish		Mutation spontanée	pigmentation, endocrine/exocrine, peau/pelage/ongles, vision/yeux, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, membres/doigts/queue, tête
Mitf ^{mi-bcc2} microphthalmia bcc2		Mutation induite chimiquement (ENU)	pigmentation, comportement, reproduction, peau/pelage/ongles, vision/yeux
Mitf ^{mi-bw} black eyed white		Mutation spontanée	pigmentation, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, peau/pelage/ongles
Mitf ^{mi-bws} black and white spotting		Mutation spontanée	pigmentation, peau/pelage/ongles
Mitf ^{mi-ce} cloudy-eye	ce, cloudy eyed, mi ^{ce} , MITF ^{ce}	Mutation spontanée	pigmentation, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, reproduction, vision/yeux, système nerveux
Mitf ^{mi-Crc} microphthalmia MRC Clinical Research Centre	mi ^{Crc}	Mutation spontanée	pigmentation, tête, reproduction, squelette, peau/pelage/ongles, vision/yeux, membres/doigts/queue
Mitf ^{mi-di} microphthalmia defective iris		Mutation induite chimiquement (ENU)	pigmentation, hématopoïèse, système immunitaire, squelette, peau/pelage/ongles, vision/yeux, système nerveux
Mitf ^{mi-enu122} microphthalmia enu 122	ENU-122	Mutation induite chimiquement (ENU)	peau/pelage/ongles, vision/yeux, pigmentation, membres/doigts/queue
Mitf ^{mi-enu198} microphthalmia enu 198	ENU-198	Mutation induite chimiquement (ENU)	aucun
Mitf ^{mi-enu5} microphthalmia enu 5		Mutation induite chimiquement (ENU)	pigmentation, comportement, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, reproduction, peau/pelage/ongles, vision/yeux
Mitf ^{mi-ew} eyeless white	mi ^{ew}	Mutation spontanée	pigmentation, peau/pelage/ongles, mortalité postnatale, tête, croissance/taille, squelette, vision/yeux
Mitf ^{mi-H} microphthalmia Harwell	GENA 163	Mutation induite chimiquement (ENU)	pigmentation, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, membres/doigts/queue, peau/pelage/ongles, vision/yeux, tête
Mitf ^{mi-J} microphthalmia Jackson		Mutation spontanée	aucun

Mitf ^{mi-Mee} microphthalmia, Massachusetts Eye and Ear Infirmary	Mitf ^{mi-2J}	Mutation spontanée	vision/yeux, pigmentation, peau/pelage/ongles, comportement
Mitf ^{mi-Or} microphthalmia Oak Ridge	Mi ^{or}	Mutation induite par radiation	aucun
Mitf ^{mi-rw} red eyed white		Mutation spontanée	aucun
Mitf ^{mi-sp} microphthalmia spotted	MITF ^{sp} , sp	Mutation spontanée	pigmentation, peau/pelage/ongles, tête, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, membres/doigts/queue, vision/yeux
Mitf ^{mi-tg} microphthalmia transgene insertion		Transgène	aucun
Mitf ^{mi-vga9} transgenic insertion 9	VGA-9, VGA-9-tg, VGA-9 ^{tg}	Transgène	mortalité postnatale, pigmentation, tête, squelette, peau/pelage/ongles, vision/yeux
Mitf ^{mi-vit} vitiligo	Mitf ^{mi-} vitiligo, vit	Mutation spontanée	pigmentation, peau/pelage/ongles, système immunitaire, croissance/taille, système nerveux, vision/yeux
Mitf ^{mi-wh} white	Mi ^{wh}	Mutation spontanée	pigmentation, peau/pelage/ongles, tête, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, membres/doigts/queue, vision/yeux, homéostasie, croissance/taille, reproduction, mortalité postnatale, squelette
Mitf ^{mi-ws} white spot	mi ^{ws}	Mutation induite par radiation	pigmentation, vision/yeux, peau/pelage/ongles
Mitf ^{mi-x} microphthalmia x	mi ^x	Mutation spontanée	pigmentation, peau/pelage/ongles, vision/yeux
Mitf ^{mi-x39} microphthalmia x39		Mutation induite par radiation	aucun
Mitf ^{mi} microphthalmia	m, mi	Mutation non spécifiée	mortalité postnatale, pigmentation, squelette, vision/yeux, système immunitaire, peau/pelage/ongles, système nerveux, tête, hématopoïèse
Mitf ^{Rorp} retinal orange patches	GENA 366	Mutation induite chimiquement (ENU)	pigmentation, ouïe/appareil vestibulaire/oreille, membres/doigts/queue, peau/pelage/ongles, vision/yeux, tête
Mitf ^{tm1.1Arnh} targeted mutation 1.1, Heinz Arnheiter	Mitf S73A- delta-neo	Transgène, knock-in	pigmentation, peau/pelage/ongles
Mitf ^{tm1.2Arnh} targeted mutation 1.2, Heinz Arnheiter	Mitf S73A ¹ , Mitf S73A ² , Mitf S73A ³	Transgène, knock-in	aucun
Mitf ^{tm1Arnh} targeted mutation 1, Heinz Arnheiter	Mitf S73A- neo	Transgène, knock-in	pigmentation, peau/pelage/ongles

L'analyse du gène *MITF* dans deux familles humaines dans lesquelles ségrégait la maladie du Syndrome de Waardenburg Type 2 a révélé la présence de deux mutations d'épissage. La première entraînait la formation d'une protéine MITF tronquée, sans domaine bHLH, la deuxième ne comportait que les 11 premiers acides aminés de la protéine MITF (TASSABEHJI *et al.*, 1994). Par comparaison avec la Souris, il était attendu que les allèles mutés soient nuls puisqu'ils codaient pour des protéines incapables de se dimériser et de se lier à l'ADN. On peut noter à ce titre une différence entre la Souris et l'Homme. Chez l'Homme, la transmission de la mutation nulle est dominante tandis qu'elle est récessive chez la Souris. Une explication pour le phénotype plus prononcé chez l'Homme serait la nécessité d'un taux en protéine plus élevé dans notre espèce afin d'obtenir une transduction efficace du signal. Les mutations majeures de Souris et d'Homme répertoriées dans la protéine MITF sont présentées dans la figure 15.

Figure 15 : Position des mutations connues sur la protéine MITF (d'après MOORE, 1995)



Légende : La position des différents exons du gène est indiquée au-dessus de la protéine MITF. Sont présentées les deux mutations humaines *MITF¹* et *MITF²* ainsi que neuf mutations de souris

Δ : délétion

3. Identification d'allèles de *MITF* associés à la couleur blanche chez le Chien

Depuis les années 50, on reconnaît chez le Chien l'existence du locus *S*, responsable à l'état sauvage de la robe unie (*S* provient du terme anglais *Solid* qui définit une robe uniforme). Dans plusieurs races de chiens, dont le dalmatien, le Beagle ou le boxer, l'allèle semi-dominant s^w est responsable de panachures blanches : les chiens Ss^w ont des plages blanches sur fond uni (robe panachée) et les chiens s^ws^w sont blancs (LITTLE, 1957). L'enjeu des études génétiques des dernières décennies a été de caractériser pour chacune des races concernées le gène impliqué dans le déterminisme de la panachure et du blanc, au travers de l'identification des mutations sous-jacentes. Chez le Beagle et le Terre-Neuve, une étude familiale a permis de lier un polymorphisme de base dans l'intron 3 du gène *MITF* à la panachure (ROTHSCHILD *et al.*, 2006). De même, le locus de la panachure du boxer a été dans un premier temps localisé sur le chromosome 20 canin, dans une région contenant le gène *MITF* (LEEGWATER *et al.*, 2007). La démonstration de l'implication directe de *MITF* dans la panachure du boxer, du Bull-Terrier et du dalmatien n'a été apportée que très récemment, à l'issue d'une analyse princeps sur la faisabilité des études d'association dans l'espèce canine (KARLSSON et LINBLAD-TOH, 2008).

Jusqu'alors, la cartographie d'un locus chez le Chien passait par l'analyse de liaison génétique, c'est-à-dire via l'étude de la co-ségrégation familiale d'un ou de plusieurs marqueurs, en général des microsatellites, avec le caractère étudié (SUTTER et OSTRANDER, 2004). Le principe de l'analyse réalisée par Karlsson et ses collaborateurs était au contraire fondé sur une analyse d'association, menée chez des chiens non apparentés, entre un haplotype de polymorphismes de base (SNPs pour *Single Nucleotide Polymorphism*) et le caractère étudié. Le succès de ce type d'étude repose sur l'identification préalable d'un très grand nombre de SNPs répartis sur le génome, ainsi que sur la possibilité de les géotyper en masse en un nombre limité d'expériences. Ces deux pré-requis ont été remplis grâce au séquençage du génome canin qui a permis l'identification des SNPs (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005) et à la fabrication de puces à ADN à haute densité (27 000 SNPs). Ces puces permettent d'obtenir l'ensemble des géotypes d'un chien en une seule expérience d'hybridation. La disponibilité de plusieurs races distinctes atteintes d'une même affection héréditaire ou porteur d'un même caractère a également facilité l'obtention des résultats (KARLSSON *et al.*, 2007).

Pour ce qui concerne la caractérisation de l'allèle s^w , l'analyse d'association s'est déroulée en 3 étapes :

1- neuf boxers fauves et 10 boxers blancs ont été géotypés. L'allèle s^w a ainsi été associé à une région de moins de 1 Megabase (Mb) ne contenant qu'un seul gène, *MITF*. Les SNPs présentant l'association la plus forte se trouvaient dans un haplotype de 800kb définis par 11 SNPs, homozygotes chez tous les boxers blancs et absents chez tous les boxers fauves (Figure 16).

2- cent trente et un chiens de robe unie ou blanche (61 boxers et 70 bull-terriers) ont alors été génotypés pour 69 SNPs de la région de 800 Kb.

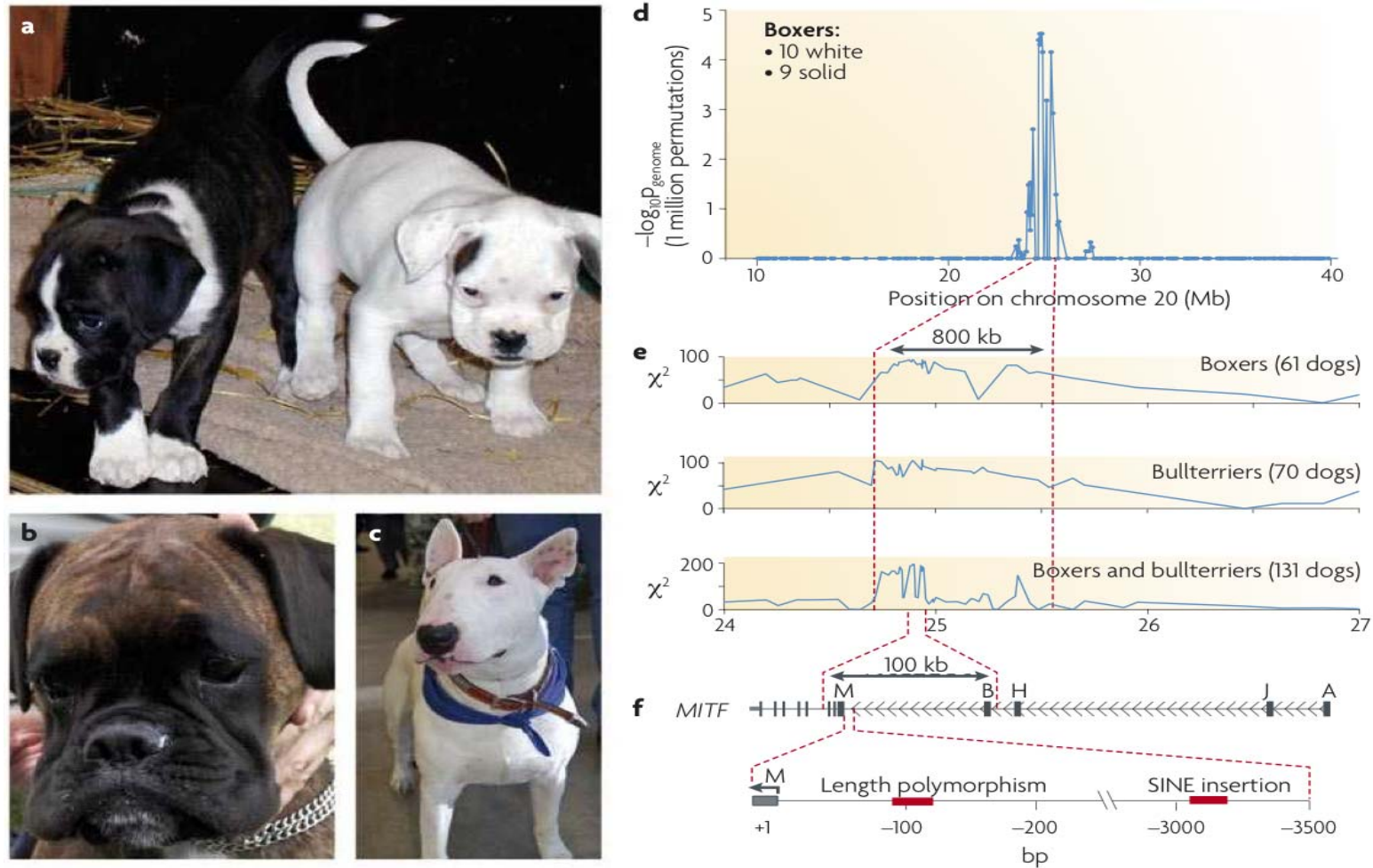
La combinaison des résultats obtenus chez les boxers blancs et les bull-terriers blancs a permis de définir une région d'homozygotie de 102 kb contenant 2 blocs haplotypiques distincts avec une parfaite corrélation génotype-phénotype. Le premier bloc de 7 SNPs contenait l'exon 1M et les exons 2 à 6 du gène. Le second bloc de 6 SNPs contenait l'exon 1B (Figure 16).

3- des chromosomes artificiels de bactérie contenant les 100 kb d'intérêt du gène *MITF* ont été obtenus à partir de l'ADN de chiens à robe unie et blanche. La séquence complète a été réalisée pour chacun d'entre eux et comparée. Cent vingt-quatre polymorphismes ont été identifiés, parmi lesquels 2 ont été retenus en raison de leur proximité avec des séquences très conservées entre les espèces. Cette forte conservation atteste d'une pression de sélection élevée et donc d'une importance fonctionnelle présumée. Ces 2 polymorphismes ont tous 2 été localisés dans le promoteur M du gène *MITF*. Il s'agissait de l'insertion d'une séquence répétée de type SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) localisé environ à 3200 kb en amont du promoteur et d'un polymorphisme de longueur sur une région de 31-35 paires de bases, localisée à ~100 pb en amont de ce même promoteur (Figure 16). Ces polymorphismes avaient un mode de ségrégation en accord avec le mode autosomique récessif du caractère blanc dû à l'allèle s^w . Tous les boxers et bull-terriers blancs possédaient 2 copies du gène *MITF* avec l'insertion du SINE et un polymorphisme de longueur de 35 paires de bases ; les chiens unis, 2 copies du gène *MITF* sans l'insertion du SINE et un polymorphisme de longueur de 31 paires de bases.

Au bilan, l'allèle s^w chez le boxer et le bull terrier pourrait être représenté par la combinaison de ces 2 polymorphismes. L'analyse de ces polymorphismes a porté également sur quelques autres races de chiens, en particulier le dalmatien. Le génotypage de 25 dalmatiens a mis en évidence la présence à l'état homozygote de l'élément SINE ainsi qu'une région de polymorphisme spécifique à la race de 32 paires de bases (KARLSSON *et al.*, 2007).

A la lecture de ces résultats, nous nous sommes posés deux questions dont l'approche expérimentale constitue le corps de la partie suivante. En premier lieu, nous avons voulu savoir si le génome des dalmatiens français contenait ces mêmes polymorphismes à la base près, ou s'il différait des données publiées à partir de chiens américains. Cette question visait à documenter, par des outils moléculaires, les flux d'échanges trans-continentaux des reproducteurs, ainsi qu'à préciser s'il existe une stratification géographique intra- raciale. Dans un second temps, nous avons voulu confirmer ou infirmer l'association possible d'une variation de ces deux polymorphismes avec la présence de patches, la couleur des yeux et, finalement, la surdité dans cette race.

Figure 16 : Cartographie, par étude d'association, du locus responsable de la couleur blanche chez les boxers et les bull terriers (d'après KARLSSON et LINBALD-TOH, 2008)



Légende :

a : photographie d'un boxer blanc (à droite) et d'un boxer flash panaché (à gauche)
 b : photographie d'un boxer solide
 c : photographie d'un bull-terrier blanc

d : cartographie du chromosome 20 pour les boxer
 e : cartographie régionale intra-raciale et inter-raciale
 f : cartographie fine et identification des polymorphismes associés au blanc

III. Etude expérimentale : analyse d'association entre la surdité du dalmatien et 2 allèles du gène MITF

A. Animaux, matériel et méthodes

1. Formation du pedigree

La formation du pedigree a été réalisée en trois grandes étapes :

- Avant 2003, nous avons reçu quelques échantillons de sang et des informations de pedigree, sporadiquement, grâce aux consultations de neurologie de l'ENVA,
- A partir de 2003, nous avons contacté le Club Français du dalmatien, représenté par le Dr Dominique Vincent, coordinateur de la sous commission de la surdité,
- En 2006, nous avons travaillé plus spécialement avec un élevage (élevage Belle rose de Mme Corinne Ouzet), dont nous avons déjà reçu des échantillons sanguins par l'intermédiaire du Club du dalmatien.

A partir du moment où nous avons pu avoir un interlocuteur privilégié qui était l'éleveuse, nous avons essayé de recueillir un certain nombre d'informations sur le phénotype des chiens, comme la présence d'un patch ou non à la naissance, la présence d'un ou deux yeux bleus. Avant cette date, recueillir ce type d'information était difficile car les éleveurs ne les notaient pas spontanément.

Un prélèvement sanguin sur tube EDTA a été récolté pour chaque animal par le vétérinaire traitant. Il se chargeait de nous les faire parvenir le plus rapidement possible par courrier, accompagné du pedigree du chien et du compte-rendu des PEA réalisés par les vétérinaires traitants. Dès réception, les prélèvements sanguins ont été conservés à +4°C avant extraction de l'ADN sous 48h.

Ainsi, nous avons constitué un pedigree de 93 chiens, dont 43 mâles et 42 femelles. Pour 8 chiots, le sexe n'a pu être retrouvé. De l'ADN a été extrait pour 84 d'entre eux.

Des informations phénotypiques supplémentaires (présence de patches et couleur des yeux) ont pu être recueillies pour 26 d'entre eux.

2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir du sang total prélevé sur EDTA a été réalisée en plusieurs étapes majeures (LEWIN et STEWART-HAYNES, 1992) :

- Lyse puis élimination des globules rouges ;
- Lyse des globules blancs ;
- Destruction des protéines ;
- Destruction des acides ribonucléiques (ARNs) ;

- Elimination des traces de phénol ;
- Formation de la pelote d'ADN et resuspension.

L'ADN récolté a ensuite été dosé par spectrophotométrie, les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement les ultraviolets de longueur d'onde 260nm. Une unité de densité optique à 260nm correspond à une solution d'ADN double brin à 50 µg/mL.

Les ADNs extraits avaient des concentrations initiales contenues dans une fourchette de 25 à 700 ng/µL. Ils ont tous été dilués de manière à disposer d'un lot d'ADN de concentration comprise entre 25 et 80 ng/µL.

3. Tests de filiation

Pour une analyse de liaison génétique, il est important de vérifier que les familles utilisées ne contiennent pas d'erreur de filiation. Dans cette optique, et dans le cadre d'un consortium européen associant l'UMR955 à des partenaires externes, l'ensemble des ADNs a été envoyé au laboratoire ANTAGENE (www.antagene.com) responsable pour le consortium du programme de filiation. La méthode utilisée a été l'analyse de la ségrégation mendélienne d'un panel de 22 microsatellites de référence au niveau international : le panel ISAG (*International Society for Animal Genetics*), validé par ANTAGENE en 2006.

4. Amplification des ADNs par PCR

La PCR, pour *Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne, est une méthode de synthèse in vitro d'acide nucléique qui permet d'amplifier de façon spécifique et exponentielle un fragment d'ADN particulier.

Pour notre étude, elle a nécessité la présence :

- d'ADN double brin qui sert de matrice (ici, l'ADN génomique des chiens),
- d'un tampon permettant de rester à pH constant optimal pour l'ADN polymérase,
- de magnésium, sous forme de MgCl₂, ion divalent catalyseur de la réaction enzymatique,
- d'amorces spécifiques de la région à amplifier. Ce sont des oligonucléotides synthétiques d'une vingtaine de paires de bases, complémentaires de chaque extrémité flanquante du fragment d'ADN à amplifier. Les séquences des amorces utilisées dans notre étude sont détaillées dans les figures 24 et 31,
- de dNTP (désoxyribo-nucléotides tri-phosphates) permettant la polymérisation des brins néoformés,
- et d'une ADN polymérase thermostable permettant la synthèse d'ADN dans le sens 5'-3' du gène ciblé par les amorces.

Le protocole détaillé des quantités relatives de chacun de ces composés qui ont été utilisés dans notre étude est décrit dans la figure 17.

Figure 17 : Composition du mélange réactionnel et étapes de l'amplification élective des séquences d'intérêt

21/09/08

PCR Dalmatien - SINE & Poly. longueur

Volume final

(en μ l)

40

Nbre de tubes

16

Composants	x 1		x nbre de tubes	
	Molarité stock	Molarité finale (en mM)	Volume (μ l)	
H2O			28,91	508,816
10X Buffer	10	1	4	70,4
MgCl2	25	2	3,2	56,32
DNA	100	100	1,5	-
Primer f	100	0,3	0,12	2,112
Primer r	100	0,3	0,12	2,112
dNTP	4	200	2	35,2
Taq Platinum	5	1	0,15	2,64
Total (vérifié)			40	677,6
			Par tube : (-ADN)	38,5

Dénat. initiale 95°C 3 min x 1

Dénaturation 94°C 20 sec

Tm 60°C 30 sec x 40 cycles

Elongation 72°C 1 min15

Elongation finale 72°C 5 min

Légende :

H2O : eau

MgCl2 : Chlorure de Magnésium

DNA = ADN : Acide Désoxyribonucléique

dNTP : Nucléotides Triphosphates

Tm : Phase d'hybridation des amorces

L'amplification de l'ADN s'est ensuite déroulée en 3 étapes :

- la dénaturation de l'ADN. Le mélange a été porté à une température de 94-95°C, les liaisons hydrogène qui lient les deux brins d'ADN entre eux ont ainsi été rompues. L'ADN s'est donc retrouvé sous la forme de deux monobrans. La dénaturation initiale a été réalisée à 95°C, les dénaturations cycliques à 94°C,
- l'hybridation des amorces (ou *primers*). Elle a été réalisée sur la séquence complémentaire du brin d'ADN à la température d'hybridation de 60°C, optimale pour nos amorces. Les températures de fusion et d'hybridation sont fonction de la composition en guanine et en cytosine de l'amorce et de la longueur de celle-ci,
- la polymérisation. L'ADN polymérase thermostable, ou Taq polymérase, a assemblé les différentes bases azotées en se servant des monobrans comme matrice. Cette enzyme a fonctionné à la température optimale de 72°C. La polymérisation s'est faite à une vitesse approximative de 1000 bases par minute.

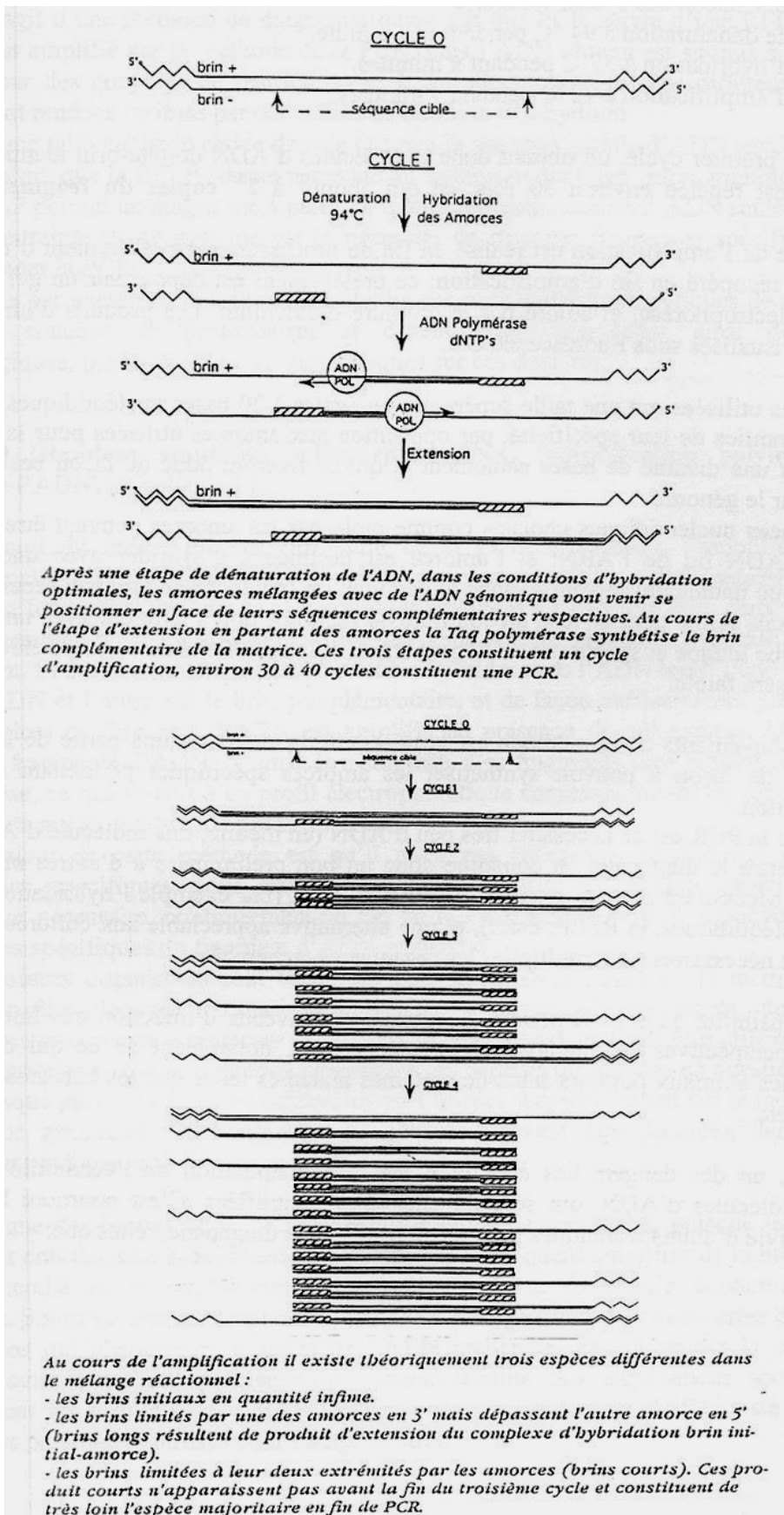
Ces trois phases ont été réalisées 40 fois. A partir d'une séquence d'ADN double brin initiale, 2⁴⁰ copies de nos séquences initiales ont été produites. En réalité, les efficacités de PCR ne sont jamais de 100% et décroissent avec le nombre de cycles. Le nombre de copies obtenues a donc été inférieur à cette estimation d'un facteur environ 100 000.

L'appareil ayant permis d'effectuer ces cycles a été un thermocycleur de la marque Eppendorf[®], équipé d'un bloc argent et programmé en température, en temps et en nombre de cycles.

Le détail des cycles effectués dans notre étude est indiqué dans la Figure 18.

La qualité, la quantité et la taille des amplicons obtenus ont ensuite été vérifiées par électrophorèse dans un gel d'agarose standard à 1.2%, coloré par des bromure d'éthidium. La taille des amplicons a été évaluée visuellement à l'aide d'une échelle de poids moléculaire (marqueur de taille) 100 pb (paires de bases) qui génère des bandes espacées de 100 pb entre 100 pb et 1000 pb.

Figure 18 : Principe d'une PCR : *polymerase chain reaction* ou réaction de polymerisation en chaîne (d'après KRIEGER, 1999)



5. Analyse des amplicons

Pour chacun des amplicons que nous souhaitons séquencer, 200 ng ont été transférés dans un tube individuel et déshydratés à 55°C pendant 30 minutes. Les tubes ont été envoyés pour séquençage à un prestataire externe : la société Eurofins MWG Operon (www.eurofinsdna.com). Le séquençage a été facilité par l'ajout en 5' de la séquence consensus du primer universel M13 (TGTAACGACGCGCCAGT) dans l'une des 2 amorces d'amplification (amorce cMITF SINEr M13U).

Les séquences obtenues ont été reçues par e-mail. Elles ont été débarrassées des séquences flanquantes du SINE ou du polymorphisme de longueur et alignées entre elles pour être comparées.

6. Bioinformatique

Les analyses de génétique moléculaire emploient de nombreux outils bioinformatiques en ligne. Pour notre étude, nous avons utilisé les bases de données et logiciels suivants :

- ensembl, une base de données consultée pour récupérer les informations de séquence du gène *MITF*.
Ensembl est système de production et de maintenance de l'annotation des génomes eucaryotes. C'est un projet commun à l'European Molecular Biology Laboratory, à l'European Bioinformatics Institute et au Sanger Institute. Ensembl a été initialement financé par le Wellcome Trust. [<http://www.ensembl.org>]
- primer3, un logiciel de détermination des amorces nucléotidiques en vue d'amplifier une région d'intérêt par PCR. [<http://frodo.wi.mit.edu>]
- blast2sequences, un logiciel d'alignement de 2 séquences. [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>]
- clustalw, un logiciel d'alignement de séquences multiples. [<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py>]

7. Statistiques

Les comparaisons des distributions observées et théoriques de chiens sourds dans notre pedigree ont été effectuées à l'aide d'un test du χ^2 bilatéral au risque d'erreur $\alpha = 5\%$.

B. Résultats et discussion

Pour des raisons de lisibilité du manuscrit, nous avons choisi de présenter les résultats et la discussion de ces résultats de façon continue et non en deux paragraphes séparés.

Dans un premier temps, nous avons cherché à préciser le mode de transmission de la surdité du dalmatien. Dans un second temps, nous avons souhaité amplifier, chez des dalmatien au statut clinique différent, les 2 régions polymorphes du promoteur *MITF-M*, en vue de confirmer ou infirmer les résultats obtenus sur des dalmatien américains puis de rechercher s'il existerait une association entre des allèles particuliers de ces polymorphismes et la présence des patches, des yeux bleus ou du déficit auditif chez les chiots dalmatien de notre pedigree.

1. Analyse du mode de transmission de la surdité

Notre étude a porté sur un pedigree de 93 dalmatien issus d'élevages français (Figure 19). Les parentés ont été vérifiées par analyse de la ségrégation de 22 marqueurs microsatellites du panel ISAG. Pour 2 chiens, nous avons repéré un marqueur non compatible sur les 22 testés. L'analyse de l'incompatibilité a montré qu'il s'agissait d'un saut de répétition. Ce cas de néo-mutation est connu et toléré et n'a donc pas constitué un motif de rejet de parenté.

L'étude du pedigree a permis de faire plusieurs séries d'observations.

Le mode de transmission semblait autosomique car nous avons observé 7 mâles et 12 femelles atteints (par exemple, les individus 24 et 25).

En effet, le mode transmission lié à l'Y a été exclu du fait de la présence de femelles sourdes.

Le mode de transmission récessif lié à l'X a été exclu car pour qu'une femelle soit sourde elle doit hériter un X muté de sa mère qui est porteuse saine et un X muté de son père qui est alors sourd. Or, toutes les femelles sourdes de notre pedigree provenaient de pères entendants.

Le mode de transmission dominant lié à l'X a été exclu car tout individu femelle sourd doit avoir un parent sourd, ce qui n'était pas le cas dans notre pedigree. Dans ce mode de transmission tout mâle sourd doit avoir une mère sourde, ce qui n'était également pas le cas.

Une famille représentative est présentée en Figure 20. De parents sains, elle a produit des femelles et des mâles entendants ou sourds, avec ou sans patches à la naissance et avec ou sans yeux bleus.

Le mode de transmission de la surdité n'était pas autosomique dominant à pénétrance complète; deux parents sains ont eu des descendants sourds (par

exemple : 42 et 12, 12 et 26, 33 et 66), tandis qu'un parent atteint n'a eu que des descendants sains (par exemple : 64).

Le mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète n'a pu être écarté formellement, mais il nous semble peu probable. En effet, notre pedigree comporte 5 portées avec des chiots atteints. A chaque fois, les parents sont entendants. Nous nous attendions, dans ce mode de transmissions, à avoir au moins un des deux reproducteurs sourds donnant naissance à des chiots sourds. Enfin, la dernière portée informative de notre pedigree ne comportait que des chiots entendants (9), nés d'une mère sourde unilatérale, ce qui est très peu probable dans le cas d'une transmission autosomique dominante même à pénétrance très réduite.

Le mode de transmission mendélien le plus probable demeurerait donc le mode autosomique récessif. Pourtant, si l'on prend l'ensemble des individus appartenant à une portée et dont le statut phénotypique des deux parents est entendant bilatéral, le pourcentage d'individus atteints était de 37,8%, chiffre supérieur aux 25% attendus. Nous avons donc réalisé une analyse statistique, à l'aide d'un χ^2 , du mode de transmission autosomique récessif de la surdité chez les dalmatiens de notre pedigree (Tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison du nombre de dalmatiens sourds et entendants théorique avec celui observé dans notre pedigree

	Sourds	Entendants	Total
Observés	18	32	50
Théoriques	12,5	37,5	50

Calcul du χ^2 :

$$\chi^2_{\text{calculé}} = \frac{(18 - 12,5)^2}{12,5} + \frac{(32 - 37,5)^2}{37,5} = \frac{(5,5)^2}{12,5} + \frac{(-5,5)^2}{37,5} = 2,42 + 0,81 = 3,23$$

$$\chi^2_{\text{table}, 5\% \text{ d'erreur}} = 3,84$$

Le χ^2 calculé étant inférieur au χ^2 de la table à 5% d'erreur, on ne peut pas rejeter l'hypothèse H0 correspondant à l'égalité des proportions.

Le mode de transmission autosomique récessif est donc compatible avec les proportions de chiots sourds et entendants observées dans nos portées.

Nous avons donc admis un mode de transmission autosomique récessif suite à un calcul qui ne distinguait pas les deux catégories de sourds (sourds unilatéraux et sourds bilatéraux). En effet, la surdité chez le dalmatien est à expressivité variable puisque l'affection peut être plus ou moins grave d'un individu à l'autre en touchant soit une, soit les deux oreilles. Il est donc envisageable que l'affection soit déterminée par un gène majeur avec un allèle autosomique récessif et des gènes modificateurs. Cette hypothèse est en accord avec les conclusions de FAMULA, MUHLE et STRAIN (FAMULA *et al.*, 2000, MULHE *et al.*, 2002, STRAIN, 2003). Dans notre étude, une transmission mendélienne récessive convient en première approximation.

On a noté la présence d'individus sans patch sourds ou entendants (par exemple : 77 et 78) et d'individus aux yeux bleus sourds ou entendant (par exemple : 92 et 91). De plus, aucun des 5 individus possédant un patch à la naissance n'était sourd (82, 84, 85, 87 et 101). Le nombre d'individus pour lesquels les données de couleur des yeux et de présence d'un patch ont été relevées étant restreint, nous n'avons néanmoins pas pu tirer de conclusions définitives quant à l'association de la surdité avec l'un de ces marqueurs phénotypiques, même s'il a semblé que la présence d'un patch à la naissance protégeait un chiot de la surdité.

Enfin, une association significative entre surdité et caractères phénotypiques n'a pu être tranchée dans notre étude en raison du nombre restreint d'animaux pour lesquels ces caractères ont été notés.

Figure 19 : Pedigree complet des dalmatiens inclus dans notre étude

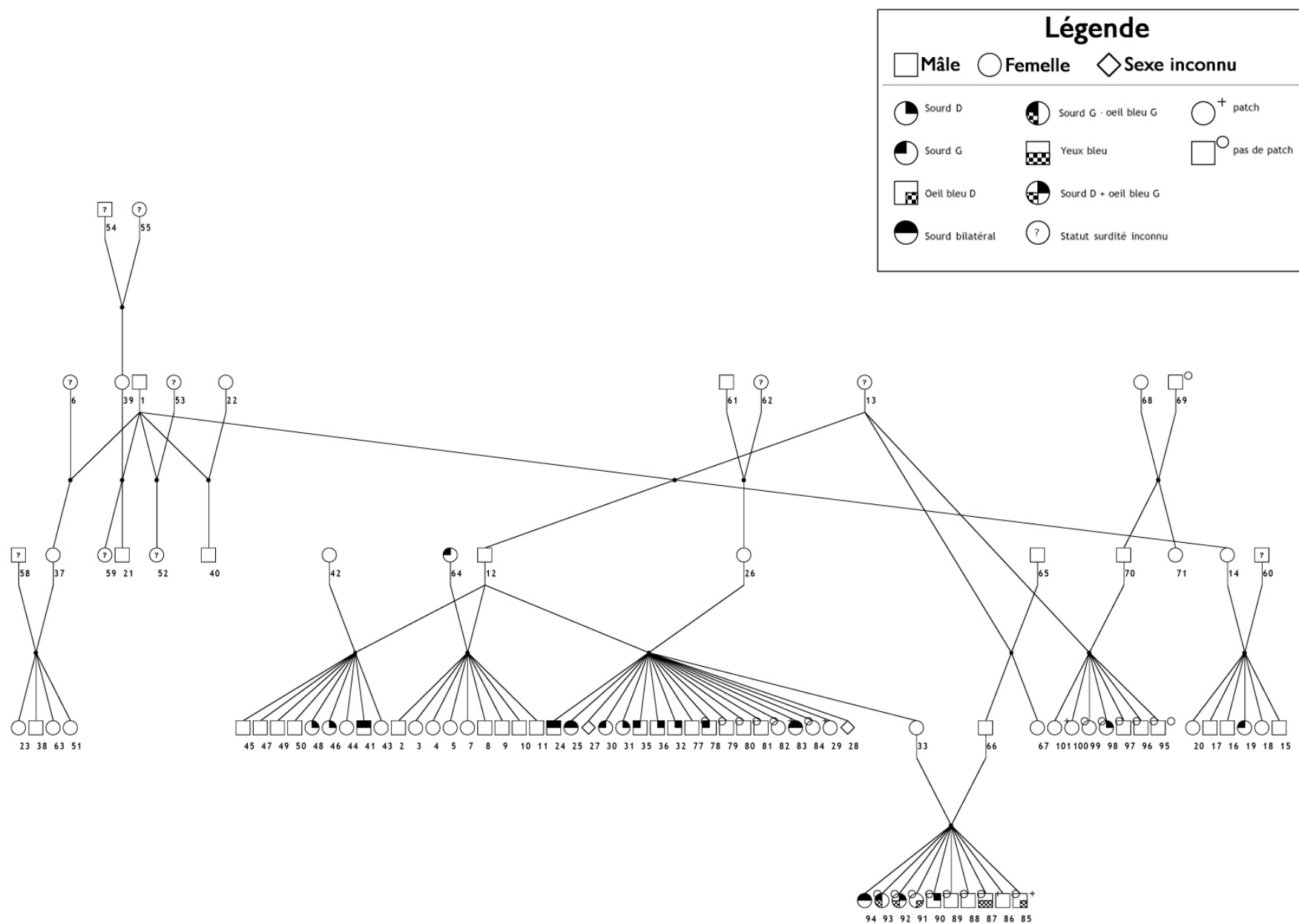
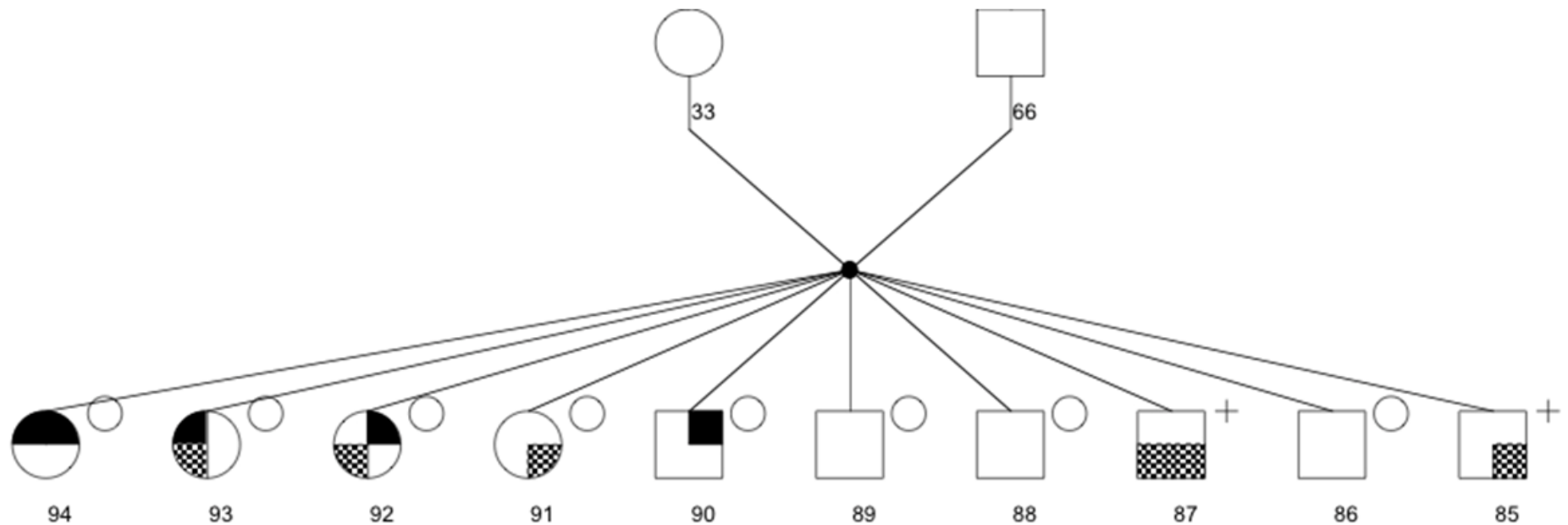
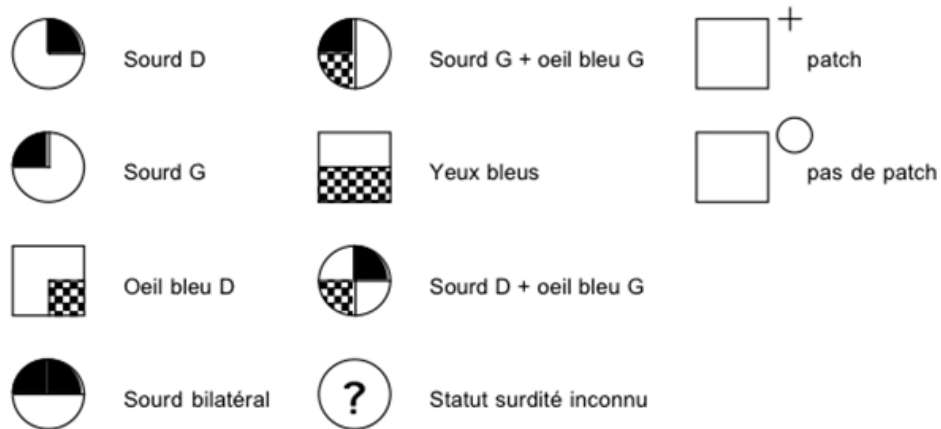


Figure 20 : Détail d'une famille représentative pour les analyses de ségrégation et de polymorphismes de séquence

Légende



2. Recherche d'une association entre le phénotype des dalmatiens français et les polymorphismes de séquence dans le promoteur *MITF-M*

a) Identification *in silico* des séquences polymorphes du promoteur *MITF-M* canin

L'objectif de cette étude était, à partir des données publiées par KARLSONN et ses collaborateurs, de retrouver les séquences polymorphes du promoteur *MITF-M* canin en vue de définir des amorces permettant leur amplification spécifique à partir du génome complet des dalmatiens du pedigree. En effet, l'article publié ne contenait aucune donnée précise sur les amorces utilisées dans le cadre de l'étude publié en 2007 (KARLSONN *et al.* 2007).

➤ Identification de la séquence du transcrit *MITF-M*

Nous avons recherché les informations de séquence du gène canin *MITF* sur le site ensembl [<http://www.ensembl.org>]. Il est localisé en région télomérique du chromosome 20 et une vue détaillée de la séquence le place à cheval sur les 2 contigs 14310 et 14311 (Figure 21). Au total, *MITF* s'étend sur une longueur d'environ 100 000 paires de bases. Le gène produit 3 transcrits dont un seul nous a intéressé : le transcrit Q864F3_CANFA, produit dans les cellules mélanocytaires. L'ADN complémentaire de ce transcrit résulte de la juxtaposition de 9 exons, dont un premier (exon 1-M) qui est spécifique et provient de l'activation du promoteur mélanocytaire *MITF-M*.

➤ Identification de la séquence promotrice du transcrit *MITF-M*

Afin d'identifier la région promotrice du transcrit *MITF-M*, nous avons récupéré les séquences du contig 14310 et celle du transcrit Q864F3_CANFA, également référencée sous le numéro NM_001003337.1. Ce transcrit contient 132 bases non traduites (5'-UTR), comprises entre les séquences [GGTGGTGTC...] et [...AAAACGTTGTT]. Nous avons aligné la séquence du transcrit et celle du contig 14310 et identifié dans la séquence de ce contig la région 5'-UTR de l'exon 1-M, correspondant aux bases 11267 à 11317 de son brin complémentaire (Figure 22, alignement des 120 premières bases).

6

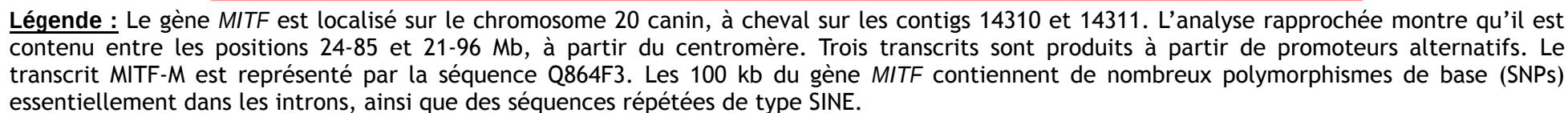
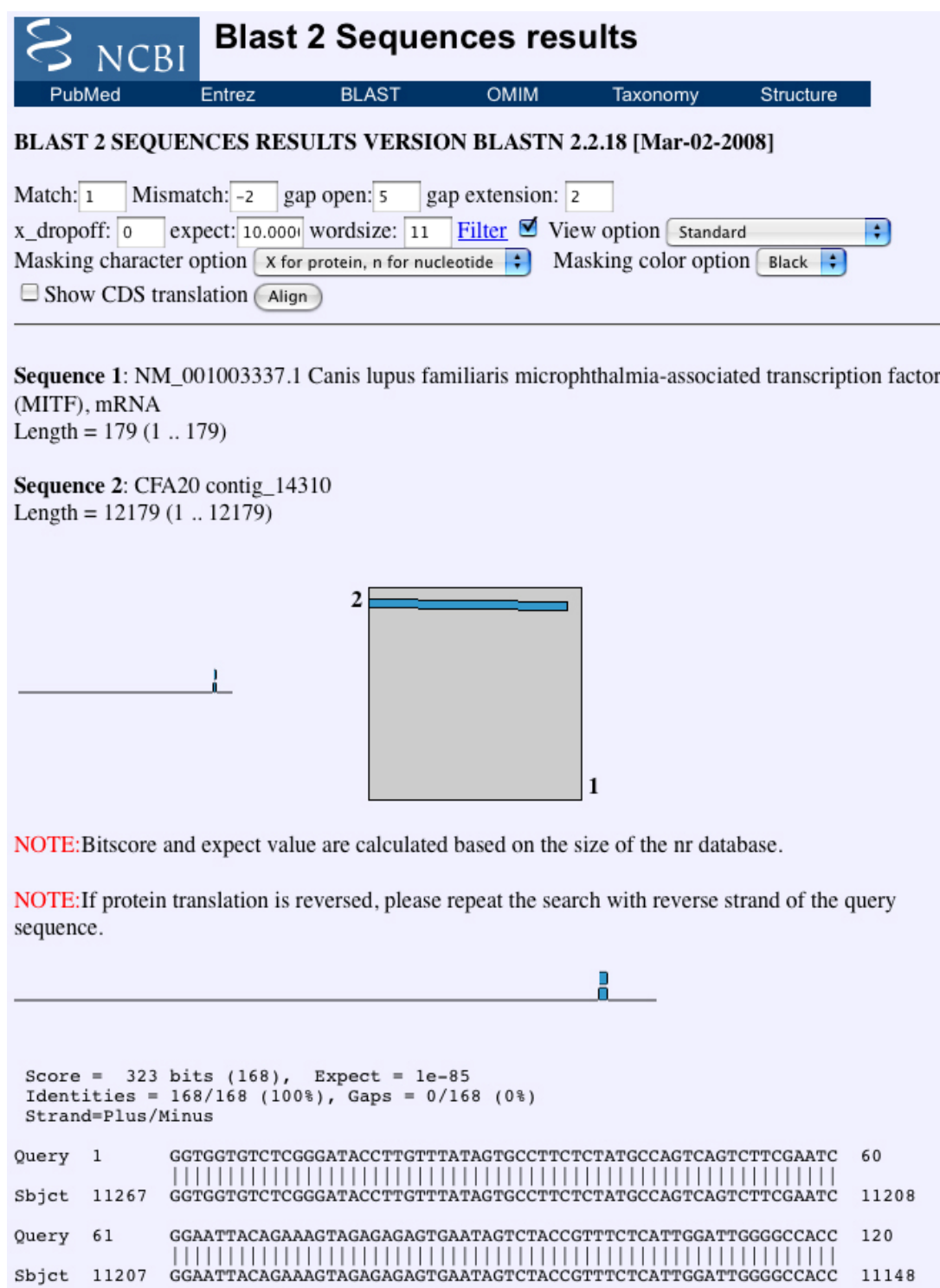


Figure 22 : Alignement nucléotidique entre les 120 premières bases de l'ADN complémentaire et la séquence génomique du gène *MITF* canin



Légende : L'alignement des 179 premiers nucléotides du transcrit *MITF*-M, correspondant à l'exon 1M (séquence 1) avec la séquence génomique complète du gène *MITF* (séquence 2) est de 100% (seul est montré ici le début de l'alignement entre les bases 11148 et 11267 du contig). Les paramètres de l'option BLASTN du logiciel Blast2 sont les paramètres par défaut.

➤ **Identification des régions promotrices contenant les polymorphismes préalablement associés à la robe blanche**

Les 2 polymorphismes du promoteur ont été décrits en positions approximatives -100 et -3000 paires de bases à compter du site de démarrage de la transcription (ATG), noté +1 (KARLSONN, 2007). Nous avons donc généré un fichier contenant les 3500 paires de bases en 5' du site de démarrage transcriptionnel, soit les paires de bases 11267 à 14767 du contig 14310. Nous avons ensuite recherché dans cette séquence les régions polymorphes. La région -100 a été facilement retrouvée car elle était riche en répétitions de désoxycytidine (C) et désoxyadénosine (A). La séquence répétée, flanquée d'environ 500 paires de bases de part et d'autre, est représentée en Figure 23. La zone de la répétition est soulignée d'étoiles. La séquence exacte de la répétition, extraite du génome de référence, était : CCCCCCCCCCAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAA, soit un total de 35 paires de bases. La comparaison de cette composition de polynucléosides avec les données publiées par Karlsonn a permis d'identifier cette séquence comme étant l'allèle 35a (KARLSONN, 2007).

Cette donnée nous est apparue en contradiction avec les conclusions de l'étude publiée par Karlsonn qui concluait que les boxers unis étaient homozygotes pour un allèle plus court, nommé 31a. Or, le génome qui a été séquencé est celui d'une femelle boxer unie (LINDLBLAD-TOH *et al.* 2005). Ce point a mis en évidence une discordance entre les données publiées par Karlsonn, ciblées sur cette région du génome, et la séquence globale mise à disposition de la communauté des chercheurs, sans que nous puissions définir laquelle des deux informations était erronée.

Primer3 Output

69

b) Mise au point de l'amplification des régions polymorphes

L'objectif de cette partie était de mettre au point l'ensemble des conditions techniques permettant l'amplification spécifique des 2 polymorphismes du promoteur *MITF-M*. Dans un premier temps, cette étape a été réalisée sur un groupe de chiens témoins appartenant à 3 races différentes et de couleur unie ou blanche.

➤ Amplification initiale des régions ciblées

Nous avons recherché des amorces permettant d'amplifier spécifiquement les polymorphismes du promoteur *MITF-M*. L'identification des meilleures séquences, permise par l'utilisation du logiciel Primer3, a reposé sur plusieurs critères. Nous avons ainsi privilégié une température d'hybridation élevée (60°C).

Pour le polymorphisme de longueur, le couple retenu produit un amplicon de 500 paires de bases. Les 2 séquences des amorces sont soulignées de caractères d'inégalité (>>> et <<<) sur la Figure 23. Leur point d'ancrage 5' sur la séquence (start), leur longueur (len), leur température d'hybridation (tm), leur pourcentage en GC (gc%), leur complémentarité mutuelle (any) ainsi que la valeur de leur at-complémentarité en 3' (3') sont résumés en haut de la Figure 23.

La même opération a été réalisée pour l'amplification du SINE et pour une région de l'exon 1 que nous avons choisie pour servir de témoin d'amplification, en vue de vérifier la qualité de nos ADNs génomiques (région de 78 pb).

Les amorces retenues sont indiquées Figure 23. Pour les 2 couples d'amplification des polymorphismes du gène canin *MITF* (*cMITF*), nous avons ajouté en région 5' d'une des 2 amorces une séquence consensus 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'. Cette séquence, nommée M13 uni (-20) et dérivée du bactériophage M13, est classiquement utilisée comme cible d'hybridation des amorces de séquençage par les laboratoires spécialisés.

Par convention, les amorces ont été notées "f" ou "r" pour désigner que l'amorce était dans le sens 5'-3' du brin "plus" (sens "forward") ou dans le sens 5'-3' du brin complémentaire, ou brin "moins" (sens "reverse"), de l'ADN amplifié.

Au bilan, l'amorce "reverse" choisie pour amplifier le SINE du gène *MITF* canin et permettant le séquençage ultérieur de l'amplicon a été appelée : *cMITF_SINer_M13U*. Les autres amorces ont été nommées selon les mêmes règles (Figure 23).

Figure 24 : Liste des séquences utilisées pour l'amplification du SINE, de la séquence répétée et de l'exon 1 du gène *MITF*

	Nom des amorces	Quantité	Séquence (longueur) et mode de purification
Amorces permettant l'amplification du SINE	cMITF_SINEr_M13U	0.05µmol	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCA TCA CCC CCT CCA AAC (36 bp) HPM
	cMITF_SINEf	0.01µmol	GGC ACA AAC AAA AAC CAG TAG A (22 bp) HPS
Amorces permettant l'amplification de la répétition	cMITF_Repetf	0.01µmol	ACA GGA TGA GGC CAT TGA AC (20 bp) HPS
	cMITF_RepetR_M13	0.05µmol	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGA GAC ACC ACC GGA AAC (36 bp) HPM
Amorces permettant l'amplification d'une partie de l'exon 1 de MITF	cMITF_Ex1_3-2_f	0.01µmol	CTC TAT GCC AGT CAG TCT TCG (21 bp) HPS
	cMITF_Ex1_3-2_r	0.01µmol	CCA ATC CAA TGA GAA ACG GTA (21 bp) HPS

Légende :

cMITF : canine MITF

Ex1 : Exon 1 de MITF

HPM : Miniatur Helium Purifier

SINE : Short Interspersed Repetitive Element

M13 : Séquence consensus dérivée du bactériophage M13 permettant un séquençage aisé des amplicons

HPS : Helium Purification System

f : forward

r : reverse

A partir d'un mélange réactionnel dont la composition est mentionnée dans la partie Matériel et Méthodes, nous avons amplifié les 3 régions, de l'exon 1, du SINE et du polymorphisme de longueur du gène *MITF*. Pour chacune de ces amplifications, nous avons réalisé 40 cycles selon un protocole de PCR classique, détaillé dans la partie Matériel et Méthodes.

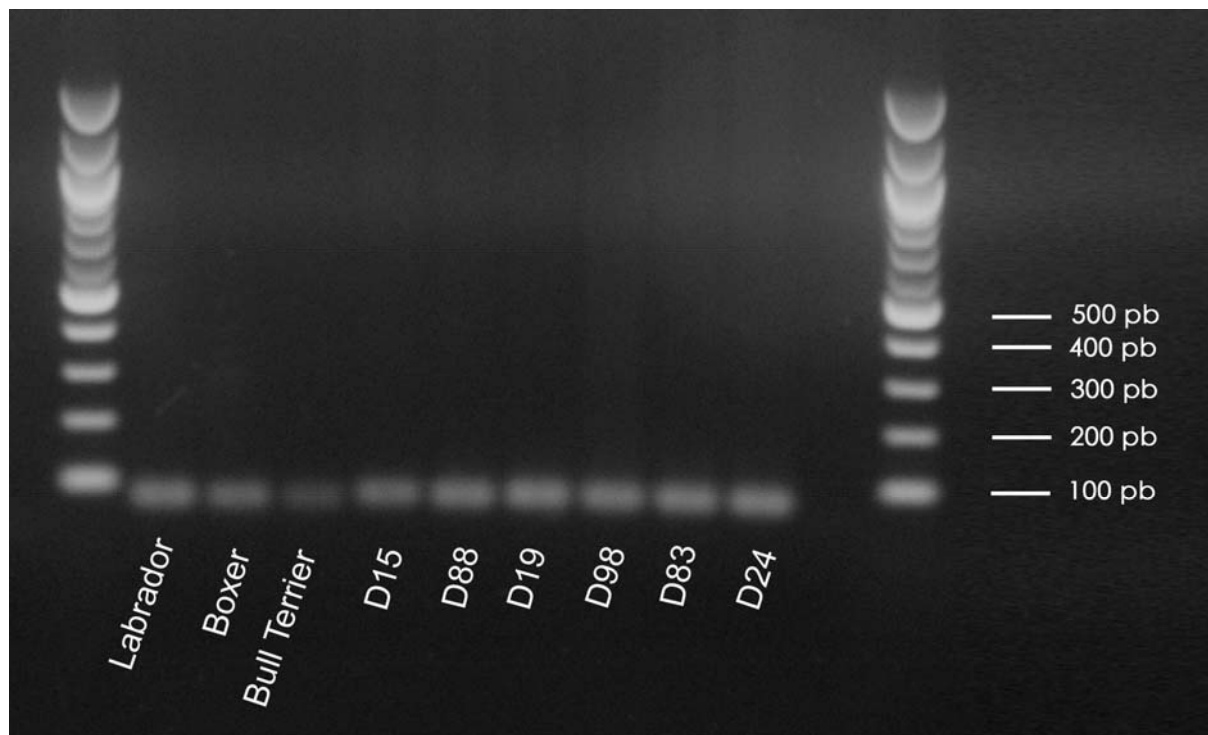
Pour chacune de ces séries, nous avons réalisé 10 réactions incluant 9 ADN génomiques de chiens et un contrôle négatif dans lequel l'ADN était remplacé par de l'eau. Les 9 chiens testés étaient un labrador, un boxer de robe unie, un bull terrier de robe blanche et 6 dalmatiens de notre pedigree. Cet ordre est celui des pistes 2 à 10 sur les Figures 25 et 26. La 11^{ème} piste est le contrôle négatif et la 1^{ère} et la 12^{ème}, le marqueur de poids moléculaire (multiple de 100 paires de bases).

La migration des produits d'amplification de l'exon 1 nous a permis de visualiser un unique amplicon par piste, d'une taille inférieure à la bande de 100 paires de base du marqueur (Figure 25). Cette taille observée était compatible avec la taille attendue de 78 paires de bases. Le contrôle négatif, au contraire, n'a produit aucun amplicon. Nous avons conclu, d'une part, que nos amorces étaient très spécifiques et notre milieu réactionnel dénué de tout ADN contaminant, d'autre part que nos ADN étaient de bonne qualité et convenablement calibrés pour réaliser les amplifications ultérieures.

La migration des produits d'amplification contenant le SINE nous a permis de visualiser un unique amplicon par piste, d'une taille légèrement inférieure à 500 paires de bases (Figure 26). Cette taille observée était compatible avec la taille attendue de 416 paires de bases chez le boxer de robe unie. En revanche, nous n'avons pu observer aucun retard de migration chez le bull terrier de robe blanche ou les dalmatiens, démontrant l'absence d'une séquence insérée de type SINE dans l'amplicon contenu entre les 2 amorces choisies.

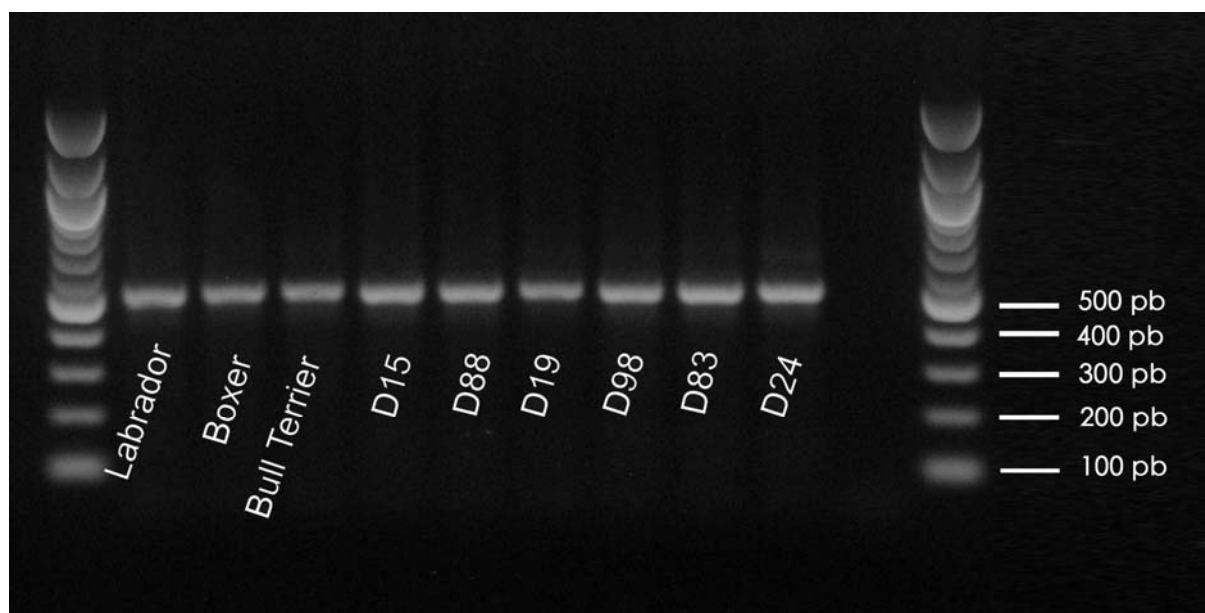
Ce résultat était incompatible avec les conclusions de l'étude menée par Karlsonn qui a conclu que les boxers et bull terriers blancs ainsi que les dalmatiens étaient homozygotes pour l'insertion du SINE à cette position (KARLSONN, 2007). Nous avons alors re-vérifié que nos amorces incluait bien la position -3000 du promoteur *MITF-M* : leur position étaient respectivement -2858 et -3274. La distorsion, préalablement observée pour le polymorphisme de longueur, entre les données publiées par Karlsonn sur le promoteur du gène *MITF* et la séquence du génome de référence du boxer semblait donc s'appliquer également à la région du SINE.

Figure 25 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR de l'exon 1



Légende : Photo du gel d'agarose après migration des produits de la PCR de l'exon 1. Les pistes 1 et 12 correspondent au marqueur de poids moléculaire. Les pistes 2, 3 et 4 sont des témoins de race différente du dalmatien. Les pistes notées D15, D88, D19, D98, D83 et D24 correspondent aux dalmatiens 15, 88, 19, 98, 83 et 24 de notre pedigree. La piste 11 est un témoin négatif.

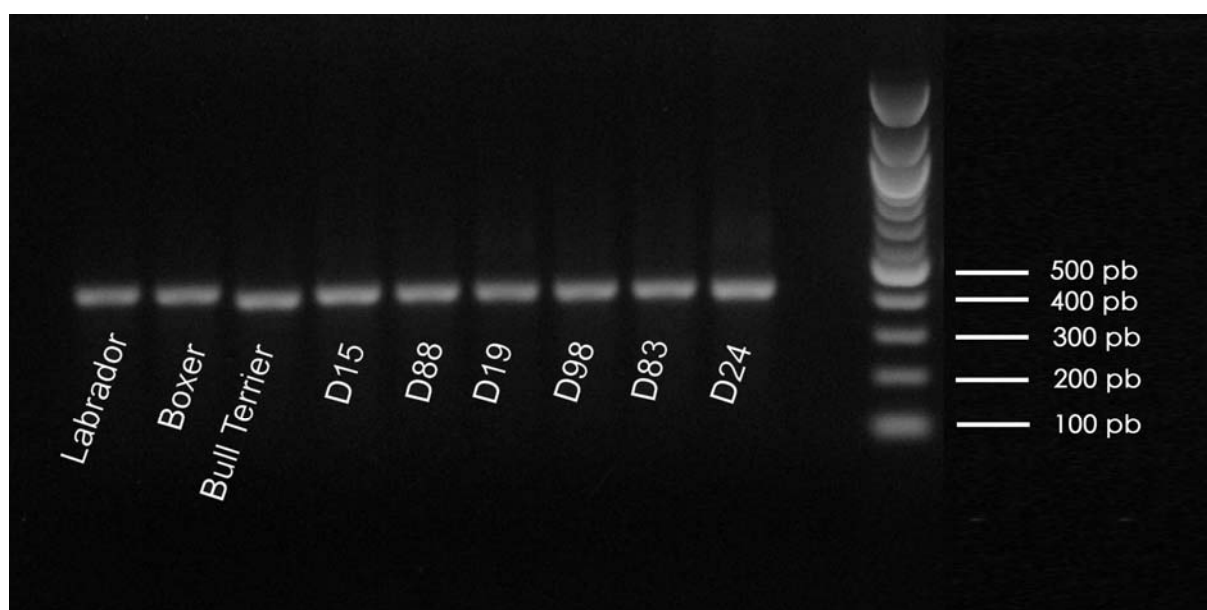
Figure 26 : Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons la région présumée d'insertion du SINE. (première paire d'amorces dessinée à partir de la séquence du génome de référence)



Légende : Photo du gel d'agarose après migration des produits de la PCR réalisée à partir des premières paires d'amorces de la région SINE, dessinées à partir de la séquence du génome de référence. Les pistes 1 et 12 correspondent au marqueur de poids moléculaire. Les pistes 2, 3 et 4 sont des témoins de race différente du dalmatien. Les pistes notées D15, D88, D19, D98, D83 et D24 correspondent aux dalmatiens 15, 88, 19, 98, 83 et 24 de notre pedigree. La piste 11 est un témoin négatif.

La migration des produits d'amplification contenant le polymorphisme de longueur nous a permis de visualiser un unique amplicon par piste, d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases (Figure 27). Cette taille observée était compatible avec la taille attendue de 500 paires de bases chez le boxer de robe unie. A ce pourcentage d'agarose, nous n'avons néanmoins pas été capables de discerner des variations significatives de taille de l'amplicon en fonction des races. Tout au plus, à fort grossissement de l'image, avons-nous pu observer une bande très légèrement en dessous des autres pour le bull terrier qui pourrait traduire une taille d'amplicon réduite par rapport à celle des autres chiens (Figure 27, piste 3).

Figure 27 : Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons de la séquence répétée



Légende : Photo du gel d'agarose après migration des produits de la PCR de la séquence répétée. La piste 11 correspond au marqueur de poids moléculaire. Les pistes 1, 2 et 3 sont des témoins de race différente du dalmatien. Les pistes notées D15, D88, D19, D98, D83 et D24 correspondent aux dalmatien 15, 88, 19, 98, 83 et 24 de notre pedigree. La piste 10 est un témoin négatif.

➤ **Correction d'une erreur d'annotation du génome de référence**

Nous avons mis en évidence qu'il existait 2 incongruités de séquence dans la région promotrice du gène *MITF* de la séquence de référence du boxer. L'une des anomalies portait sur la longueur du polymorphisme et l'autre sur l'absence de SINE amplifié chez des animaux décrits pour en contenir un en 2 exemplaires (KARLSONN *et al.*, 2007).

Dans le but de résoudre ce paradoxe, nous avons décidé d'écrire à Elinor Karlson pour lui exposer nos résultats et les questions qu'ils soulevaient. Dans une réponse très chaleureuse, elle nous a expliqué les raisons de nos difficultés : "The reference genome sequence is not correct around the SINE. Tasha, the dog we sequenced, is flash (heterozygous) pigmented. Probably because she is heterozygous for the SINE insertion, the genome assembly had difficulty here and the sequence is incorrect. Once we worked that out, we went back and generated finished quality sequence for each of Tasha's haplotypes for that region, and it is that sequence we used in the paper."

Nous avons ainsi appris la raison de la mauvaise annotation du génome de référence dans cette région. La chienne ayant servi pour le séquençage était en fait panachée, donc hétérozygote pour l'insertion du SINE. Cette insertion a produit, lors de la séquence, des amplicons de tailles variées qui ont introduit des confusions lors de l'annotation. Cette difficulté a été résolue par le clonage et re-séquençage des deux allèles de Tasha, clonés individuellement dans des chromosomes artificiels de bactérie (BACs ; E. Karlson, données personnelles). A l'issue de cet échange avec Elinor Karlson, nous avons reçu d'elle la séquence mise à jour de l'allèle "uni" du promoteur de *MITF-M* chez le boxer (Figure 28). Nous avons retrouvé sur cette nouvelle séquence les séquences des amorces flanquant le polymorphisme de longueur (Figure 28, soulignées en bleu autour du polymorphisme surligné de vert). De plus, l'allèle du polymorphisme était bien l'allèle 31a décrit pour les boxers unis par Karlson et ses collaborateurs (KARLSONN *et al.*, 2007). L'alignement produit entre les 2 séquences répétées a permis d'observer les différences entre la version valant pour le boxer de robe uni, reçue d'Elinor Karlson (en vert sur la Figure 29), et celle de l'allèle associé à la robe blanche et figurant dans le génome de référence (en rouge sur la Figure 29).

En revanche, nous n'avons pu retrouver sur cette nouvelle séquence les amorces que nous avons dessinées pour l'amplification du SINE. Nous avons aligné la séquence promotrice du gène *MITF-M* telle que nous l'avons reçue d'Elinor Karlson avec la séquence du génome de référence. Nous avons observé que les 2200 paires de bases en amont du site de démarrage de la transcription s'alignaient, les 1800 premières avec une exactitude remarquable (Figure 30, en bleu foncé), les 400 suivantes avec des scores d'alignement plus faibles mais néanmoins significatifs (Figure 30, en bleu clair). Ainsi, nous avons confirmé que la séquence de référence disponible sur les bases de données est erronée dans la région d'insertion du SINE, rendant son amplification impossible avec notre première paire d'amorces. Nous n'avons pas cherché à savoir à quelle séquence du génome canin correspondait l'amplicon que nous avons néanmoins amplifié (Figure 26).

Figure 28 : Séquence génomique corrigée du promoteur *MITF*-M canin (données reçues d'Elinor KARLSSON suite à nos échanges d'e-mail)

Structure génomique du promoteur MITF-M

Violet :	Région d'insertion de l'élément SINE
Vert :	Polymorphisme de longueur
Jaune :	Partie codante de l'exon 1M
Rouge :	Séquence codante (démarrage avec un ATG)
<u>tgcttgcttgattgctattt</u>	
<u>aaagtccagagagcccgag</u>	Amorces pour l'amplification élective (PCR) du SINE

>Séquence de référence MITF mise à jour (Boxer fauve)

tataaagtgagtcgggggagggggcgaattaggtgggatagcaactgagtggaatttaataacccctttaataatcccttaacttactgagcaacaggatgacattttctccctaacaatc
 aaaataagaaatctgacatctctgttgatgtgttaaaaaaataaattgtgaoactaaaggattatgaggatcttccctcaattgtattacattctgggtttacaaatagta
 gaggcaacagaagaacagtgaaacctggatgggttttttttttccctctagtgaattcttcatcactcaagatggtaatatctctaggtaccatctcacactgatgtg
 ctccaggatcttttttgaatgaaattgatggaataaacctgtcattgtcacctgggaagtgccacagctaaagtgtgacagttagaaggtgatccattccacttccctt
 gtatcatatcaattcaggatctgaatgaagaaaggaaaagcacaaaagatagtagcagtaaacagggaagaaaggttcaaaagcctttggaattctgtaccttaacaaga
 aagctaattgtactttatttatatgaaatattcattatatacaacaaaatagatgtggtttgatagagcatgaagtattctagtttttttttttgtttttttttttgtgg
 tctgtgcttcaagtgctcagccttgatacctttgataccttgatacctacctacctttgatatctgaattcgtaaacttgggtgggttagtttgaaggtcaaccctatgcaa
 aattatcagggaatacatacagatgtttaaattgatatatatgttctcattttata**tgcttgcttgattggctattt**agaactaacataaggaaagtcactaacataaaaag
 ctatggtttagggtgggtgagacacagaattttatctatgctttaa**at**gtctataggaactttagagcctcacataatggctgtgaggaagtaaaaggggttaggg
 tcttactcagcatcttccggctgagagagggcaagtagacaacacaggtgtgtcacacacagctgatcacacagctggtgaatagactggctaaggtgggtgggtgaataa
 ctcaagcactacctgtattctagatcagtggtttct**aaagtcagagagcccccga**gggggtctccaggaccctgcagtggttctgcagggccaaaacaattttcttaataac
 actgagagattcttttccctttttcatgctcattgtgtgatctttacgttagagttttacgaaggcttcagcaggttaaaatgtcattgttctgtatggtcagtgcaatata
 tgctcctgtataatcttgtgttttaaaaattgctgctttatttcttaatatggtgaacgctgatagatataaattcacgtaaaactaaagttgaagggtctaaaatgggtt
 taagacaaaagtttgagaattgctgttttcagatatattgctaagcctgttagaagtgatgatttcatttaagtctgcgataactctacgatggaggctcagctatcatcc
 ctattgagcatgtgaggagatgaagcctagaanaagtttaagcttgcgaagatcacaggtcacataaattaggaagttgcaagtcacaattcgaaacacaggttttga
 ttcttaactatttctgctgactgtgctgtcaggcctgctgtctctccaaaagcaccaggaaataacctggatttggacagtaacttgcctcagaacctggggccacctcccc
 acccccgggaatatagataggaaggtgatcctcaaggatggatgaagcaaaagaccacattcttagtggcttatgggtgagtcagtgacagatgtgtttgacttgtttt
 atgcagtaacgaaaagtcacaaactttgggtgtcaattttttaatctgggaagtttaacttaaaaaagtttagattgccattggaagatctgtactaagttgggtgtactcatat
 gtccacaaactcgcagctttatgtcagctatttcttttatttatttttttaatttttaatttttagtgggttcaattcagataacatcacagaataaccccaagtcgcccg
 caccatttcaactccacccccccgctctctcccttttaccaccctagtctgttcccagagttagtatgcttttacgttctgtctccctttctgatatttccacacatt
 tcttctcccttcccttatatttccctttcactattatttatattccccaaatgaatgagaacataaatgtttgtccttctccgactgacttacttcaactcagcataatacc
 ctccagctatttcttttagatgagatattgtgtgtctagtttgccacaggcctcacacttctattatccaaagttcatatatgttccctgtttctgttacctgttttca
 gtgtttggattagaacacagctagagacgttccactcctgcataagattttatagccaatttctactcaacttatttgaaaactaaaagacactggcggtaaggggacaaa
 atacatttcaactctgattaccctaacctgggatatagttaagagctcactggcaatgccaaagagatagcaggtgtcttcttccgtactaaagcataaaattctaattcat
 taaagaataaggatctgccagtgaaatcaacatttatttttaaatgtgtagcccttcttttttaagtgaatagtgaataaaacacattacaccattgcccctattttat
 gttatttttagtaattgtctgtgtcctcatcattatcgtgtctggaccctttcataaacctaaaatgtctctgtgaacctctgtgtacatgttagatcagtcatttga
 aatttagagattgccaataataaggactatttcttccggacgtttggatagaattactgaatttcaaagtttttagtcttaagatagactcaccatttccagcagtgaaatata
 accatttatcataaatttttagatgtattttgtgctcttttcttcttctgtctccacagactcaaggttctataaaactggcagttaggtctgtttgttcacagtg
 attttccatgtcttgcgaagatgttagcacataaaatggtattttaataatggaaacaagttaaatgagtaaaagatatatcagtcataatgtatgaataacttatttcttctcta
 tccctaagaattattattattattattattattattattatttaacccataagaattataataaaaagatttttagtacaagttttctgcttccagcttgattaagttggg
 gagacatttatttcttatttctccacataaataatacatccagtcctgtgtgtgtgtatgtttttctgttctgttttaggatagtttcccttctctctgatcagtaggaaaga
 tccatatccatgcagtttaagaataagatgcattatgagaccaggat**acaggatgagggcattgaac**ttgaaaatgcagcacagagactcctccagacccttctctgca
 gttggcagttacagagttatgtggccattagaanaagctcatgtgttaatagtagcttttaggcgtgtgtcttctccaaaggggcagccagctcttaacctatgtcgaagag
 aataccattgtctattaatactactggaactaaagatgaatagtgaattggccttgatctgcacagtgagtttgactttgatagctcatcacttaaaaagattcttttata
 ttatgaaaagcatgacgtcaagctggggggcggggggaattgataccaatatgtaagaccaagctcgtaggact**cccccccccaaaaaaagggaagaaaaaaadgccc**
 ctgttgcgaattgggttttttttttttaaacatgcataactaattagcttaggttatataagcagggtcgtgtgataaa**gtttccgggtggtgtctcgggatacctgtt**
ttatgtgctcttctctatccagctcagctcttccagctcgaattcagaagtagagagagtgaaatagctaccgttttctattggattggggccacctaaaacggtgttAT
GCTGGAAGTCTAGAATATAATCACTACAG

Légende : Séquence de 4200 pb correspondant aux 4000 pb du promoteur MITF-M corrigées par KARLSSON *et al.* 2007 et à l'exon 1M. Les amorces permettant l'amplification du SINE, identifiées grâce au logiciel Primer3, sont indiquées.

Figure 29 : Alignement nucléotidique entre la version corrigée et la version publique (génom de référence) du polymorphisme de longueur contenu dand le promoteur *MITF-M*

```

Karlsson 3837 AAGCTCGTAGGACT-----31 pb-----
                |||||
CFA_Réf   139 AAGCTCGTAGGACTCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAGGAAAAAAAAGGCCCCCTTG TTC
                |||||
                -----35 pb-----

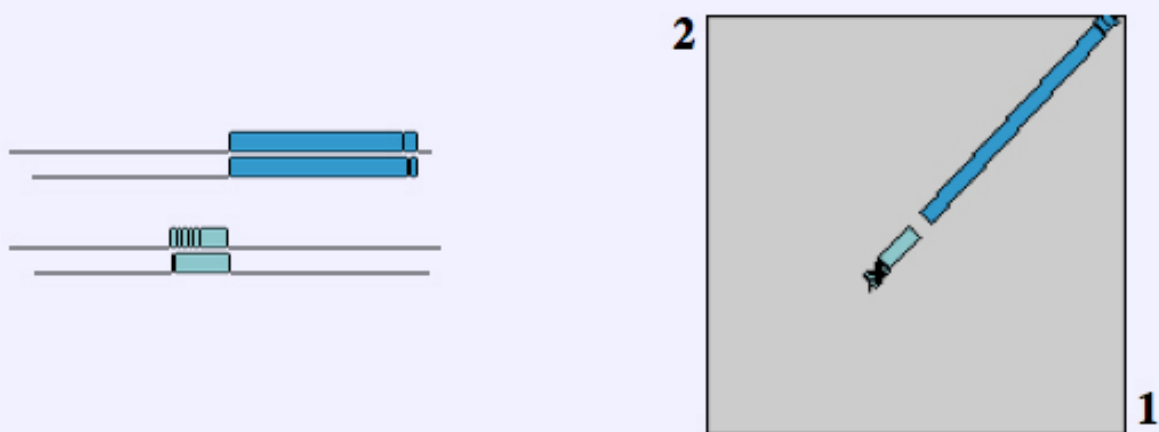
```

Légende : La séquence corrigée du polymorphisme de longueur (KARLSSON) montre que chez le boxer fauve, la séquence est de 31 pb, conformément à l'article de référence (KARLSSON *et al.*, 2007) et non de 135 pb comme l'indique le génome de référence (CFA-réf).

Figure 30 : Alignement nucléotidique entre la version corrigée et la version publique (génom de référence) des séquences génomiques du promoteur *MITF-M*

Sequence 1: Promoteur MITF-M_E-Karlsonn
Length = 4105 (1 .. 4105)

Sequence 2: Promoteur MITF-M_ReferenceCFA
Length = 3766 (1 .. 3766)



Légende : L'alignement nucléotidique de la séquence promotrice corrigée (séquence 1) avec la séquence promotrice du génome de référence (séquence 2) montre une discontinuité entre les deux et atteste d'une erreur d'annotation de la région.

➤ Reprise des conditions d'amplification du SINE

Le site d'insertion du SINE figurait sur la séquence que nous avons reçue d'Elinor Karlsonn (Figure 28, en violet). Nous avons exploité cette donnée pour redéfinir une paire d'amorces encadrant ce site d'insertion (Figure 28, soulignées de bleu et reprises dans la Figure 31).

Figure 31 : Composition des amorces utilisées pour l'amplification du SINE, déduites de la séquence corrigée

Oligo Order Basket

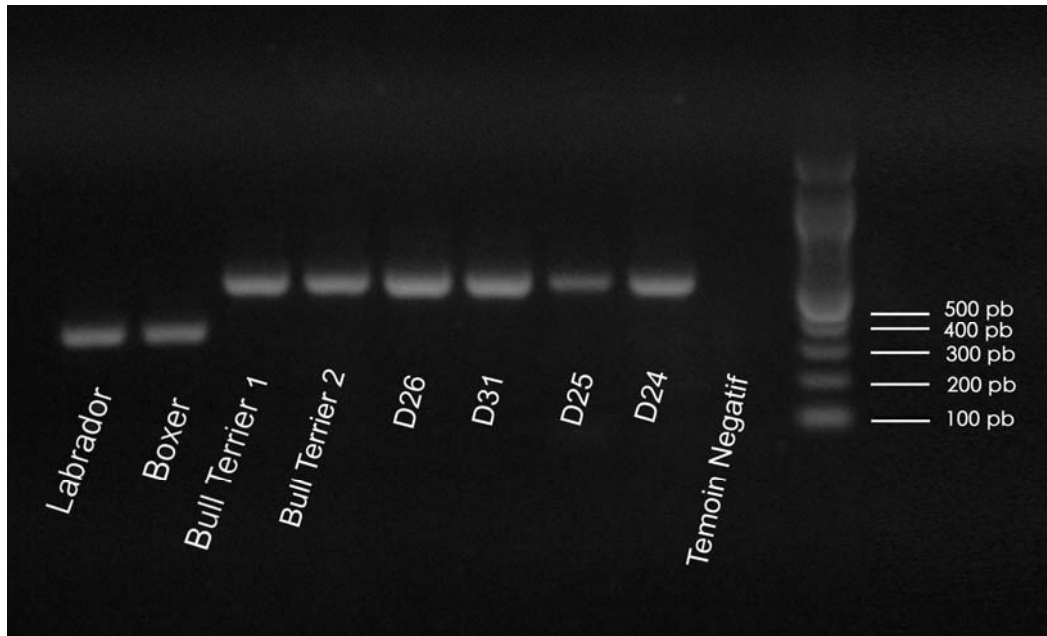
Name	Scale	Sequence
Unmodified Oligos:		
cMITF_SINE2f_M13	0.01μmol	TGT AAA ACG ACG GCC AGT tgc ttg ctt gat tgg cta ttt (39 bp) HPM
cMITF_SINEr	0.01μmol	ctc ggg gct ctc tga ctt t (19 bp) HPS

Légende : La séquence des deux amorces identifiées pour amplifier le SINE est indiquée en lettres minuscules. En 5' de l'amorce cMITF_SINE2f_M13, ont été ajoutées les 18 pb de la séquence du primer M13 universel, utilisé pour amorcer le séquençage ultérieur de l'amplicon.

A partir de ces nouvelles amorces, nous avons repris le protocole mentionné dans la partie Matériel et Méthodes et obtenu les amplicons représentés Figure 32. Chez le labrador et le boxer de robe unie (pistes 1 et 2), nous avons observé un unique amplicon de taille comprise entre 300 et 400 paires de bases, compatible avec les 333 paires de bases attendues. Chez tous les autres animaux, nous avons observé un unique amplicon dont la taille était augmentée pour atteindre la valeur approximative de 500-600 paires de bases (pistes 3 à 8). Les animaux testés étaient 2 bull terriers (pistes 3 et 4), un dalmatien entendant bilatéral (piste 5), un dalmatien entendant unilatéral (piste 6) et 2 dalmatiens sourds (pistes 7 et 8). La piste 9 correspondait à un contrôle négatif pour lequel l'ADN avait été remplacé par de l'eau. Le différentiel de taille observé était parfaitement compatible avec l'insertion d'un SINE dont la taille moyenne est d'environ 190 paires de bases, auxquelles il faut ajouter les répétitions flanquantes (KIRKNESS *et al.*, 2003).

Nous avons donc conclu que nous avons travaillé sur la bonne séquence. Nous avons de plus confirmé qu'à la différence des 2 individus de robe unie, les 2 bull terriers et les 4 dalmatiens que nous avons testé, tous en provenance d'élevages français, étaient homozygotes pour l'insertion du SINE décrit par KARLSONN et ses collaborateurs. Enfin, nous n'avons pas observé de différence significative dans la taille des amplicons obtenus chez les bull terriers et les dalmatiens entendants ou sourds.

Figure 32 : Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons contenant la région d'insertion du SINE, obtenus à partir d'un panel de chiens de différentes races



Légende : Photo du gel d'agarose après migration des produits de la PCR réalisée à partir de la seconde paire d'amorce de la région SINE, dessinées à partir de la séquence corrigée.

La piste 10 correspond au marqueur de poids moléculaire. Les pistes 1 et 2 sont des témoins de race différente du dalmatien ne contenant à priori pas de séquence SINE.

Les pistes 3 et 4 sont des témoins de race différente du dalmatien contenant à priori une séquence SINE.

Les pistes notées D26, D31, D25 et D24 correspondent aux dalmatiens 26, 31, 25 et 24 de notre pedigree. La piste 9 est un témoin négatif.

c) Analyse ciblée des polymorphismes dans notre pedigree

Nous avons donc mis au point les conditions techniques d'analyse des polymorphismes du promoteur *MITF-M* chez nos chiens. Dans l'objectif de les comparer chez des dalmatiens de statut phénotypique distinct, nous avons choisi d'étudier la ségrégation de ces 2 polymorphismes dans une famille représentative de notre pedigree.

➤ Critères de choix pour sélectionner la famille analysée

Nous avons cherché à évaluer s'il existait, chez des individus représentatifs de sous-populations d'intérêt, des différences de composition ou de longueur de séquence dans ces 2 régions polymorphes du promoteur *MITF-M*. Dans un premier temps, pour des questions de coût expérimental, l'analyse devait porter sur un faible nombre d'individus. La fratrie des individus 85 à 94, issu du croisement entre la mère 33 et le père 66, correspondait parfaitement à nos besoins (Figure 21). En effet, de parents entendants bilatéraux, les individus de la portée étaient éclatés en de multiples sous-groupes pour lesquels nous pouvions supposer qu'il existait des variations de séquences, causales pour ces différents caractères phénotypiques. Cette famille, appelé par la suite "famille-panel", comportait des mâles et des femelles, des individus aux yeux bleus ou marrons, nés avec ou sans patch et de statut varié vis à vis de leur audition. Deux femelles et un mâle était entendants unilatéraux, une femelle était sourde tandis que les 6 autres individus étaient entendants bilatéraux.

➤ Analyse de l'insertion du SINE en position -3033

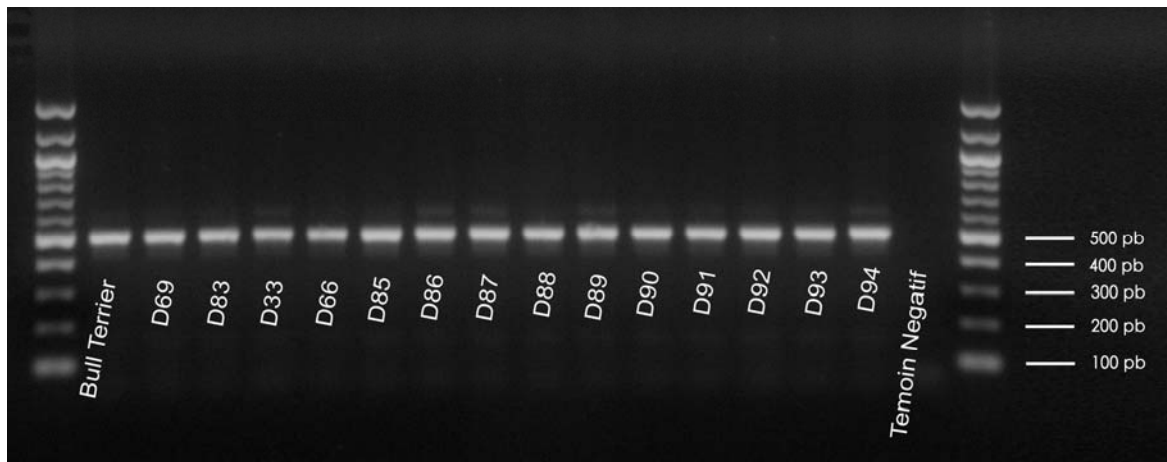
Il a été montré que les SINEs contenaient une région répétée riche en oligo(dA) dont la longueur, variable, peut être associée à une expression phénotypique également variable. Ainsi, la robe "Merle", caractérisée chez le Chien par la juxtaposition de zones normalement colorées et de zones diluées, a-t-elle été liée à l'insertion d'un SINE dans le gène *SILV* (*silver*). Ce caractère de pigmentation est hérité de façon dominante avec une pénétrance incomplète et il été démontré que le fait d'hériter, pour un chiot, d'un allèle contenant une queue oligo(dA) raccourcie lui conférait une pigmentation normale (CLARK *et al.*, 2006).

Afin de vérifier si des variations de séquence pouvaient être associées à la couleur des yeux, à la présence de patches ou au développement de l'oreille interne, nous avons donc amplifié le SINE du promoteur *MITF-M* chez l'ensemble des individus de notre famille-panel et chez trois autres chiens (Figure 33). Ainsi, les chiens étaient un bull terrier (piste 1), les dalmatiens n° 69 et 83 (pistes 2 et 3), la mère et le père de notre famille-panel (pistes 4 et 5) et les 10 chiots par ordre croissant de leur n° (pistes 6 à 15). La piste 16 correspondait au contrôle négatif. Nous avons choisi d'ajouter les chiens n° 69 et 83 en raison, respectivement, de son éloignement génétique avec notre famille-panel (69) et pour ajouter un individu sourd étranger à cette portée (83). Ces chiens supplémentaires étaient destinés à

élargir la diversité des chiens testés, au delà du seul isolât génétique que représentait notre famille-panel.

Pour l'ensemble des ADNs testés, nous avons obtenu un amplicon unique d'une taille comprise entre 500 et 600 paires de bases, démontrant que tous les chiens contenaient 2 allèles avec l'insertion du SINE (Figure 33).

Figure 33 : Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons contenant le SINE, obtenus à partir d'un panel représentatif de dalmatiens



Légende : Photo du gel d'agarose après migration des produits de la PCR réalisée à partir de la seconde paire d'amorce de la région SINE, dessinées à partir de la séquence corrigée.

Les pistes 1 et 18 correspondent au marqueur de poids moléculaire. La piste 1 est un témoin de race différente du dalmatien contenant à priori une séquence SINE.

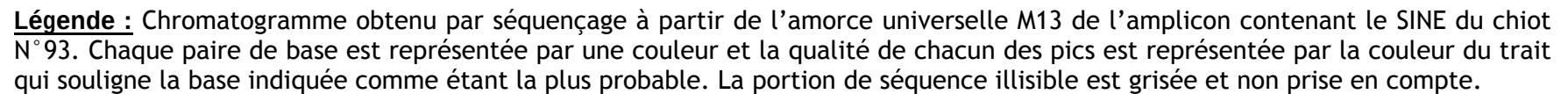
Les pistes notées D69, D83, D33, D66, et les pistes D85 à D94 correspondent aux dalmatiens 69, 83, 33, 66 et 85 à 94 de notre pedigree.

La piste 17 est un témoin négatif.

Nous avons ensuite envoyé à séquencer 2 µg de chacun des ADNs en vue de déterminer la séquence exacte de l'amplicon. L'ADN a été débarrassé des amorces et nucléotides libres et séquencé par la société MWGEurofins (<http://www.eurofinsdna.com>). Tous les amplicons, à l'exception de celui du chien n°89, ont été convenablement séquencés et les résultats nous sont parvenus par courrier électronique. L'échec du chien n°89 était lié à une mauvaise purification de l'ADN. Nous n'avons pas jugé utile de relancer l'amplification pour ce chien appartenant au groupe des mâles entendants bilatéraux déjà représenté par les 2 individus 86 et 88.

Pour exemple, le chromatogramme du chien n°93 est représenté Figure 34. Classiquement, la zone initiale du chromatogramme, constitué des premières paires de bases illisibles, est grisée et n'a pas été considérée dans les analyses ultérieures. La partie du chromatogramme correspondant à la séquence insérée (à l'intérieur de la séquence génomique normale [TTTTAA..AATTGTC]) est identifiée par un fond jaune. Nous pouvons remarquer que dans cette région, la qualité de la séquence obtenue a été maximale (≥ 30), ce qui apparaît sur la figure 34 par un trait de couleur verte sous chacun des désoxynucléotides.

6



Nous avons extrait de cet amplicon la séquence du SINE, d'une longueur de 198 paires de bases. Au laboratoire, un SINE particulier a été préalablement identifié chez le labrador Retriever : inséré dans l'exon 2 du gène *PTPLA* (*Protein Tyrosin Phosphatase-Like, member A*), ce SINE produit des aberrations transcriptionnelles conduisant à une anomalie fonctionnelle des muscles squelettiques, appelée myopathie centronucléaire et transmise selon le mode autosomique récessif (PELE *et al.*, 2005). Nous avons aligné ces 2 SINEs (Figure 35). La quasi-totalité du SINE séquencé chez le dalmatien s'est alignée avec celui associé à la myopathie du labrador (196 paires de bases sur les 198). Entre les 2, le pourcentage d'alignement parfait des paires de bases a été de 92% (182 paires de bases sur les 196, Figure 35), tandis que 5 paires de bases manquaient dans la séquence du SINE du labrador (ou ont été rajoutées dans celle du SINE du dalmatien). En particulier, nous avons noté une différence d'un duo de paire de bases à l'intérieur d'une répétition "CT", en vert sur la Figure 35. Ce phénomène bien connu proviendrait, entre autres mécanismes possibles, du glissement de l'ADN polymérase également appelé « glissement de brin » lors de la duplication de l'ADN (DEBRAUWERE *et al.*, 1997).

Figure 35 : Alignement nucléotidique du SINE obtenus chez les dalmatiens avec celui identifié chez les labradors atteints de myopathie centronucléaire

Sequence 1: SINE-MITF_Dalmatien

Length = 198 (1 .. 198)

Sequence 2: SINE-PTPLA_Labrador

Length = 236 (1 .. 236)



Score = 285 bits (153), Expect = 4e-74
Identities = 182/196 (92%), Gaps = 5/196 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	GGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTG	60
Sbjct	15	GGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTGGCGCCTGCCTTTG	74
Query	61	GACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTCTGCC	120
Sbjct	75	GACCCGGGATCGAGTCCCACGTCGGGCTCCCGGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTCTGCC	134
Query	121	TATGTCTCTGCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAATAAATAAATAAATAA	180
Sbjct	135	TGTGTCTCTGCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGTGACTATCATAAATAAATAAATAAATAA	189
Query	181	AATTAAAAAGAAAAA	196
Sbjct	190	AATTAAAAA	205

Légende : La séquence du SINE obtenue à partir de l'analyse du promoteur MITF-M du dalmatien présente une similitude de 92% avec celle du SINE inséré dans l'exon 2 du gène *PTPLA*, et responsable de la myopathie centronucléaire du labrador retriever lorsqu'il est présent à l'état homozygote chez un chiot. Ce SINE dérive d'une séquence codant initialement pour un ARN de transfert (ARNt).

Ces séquences SINEs sont membres de la famille des SINEC_Cf, très largement amplifiés dans le génome canin et provenant de la rétrotransposition d'une séquence dérivée d'un gène mitochondrial d'ARN de transfert, surlignée de bleu dans la Figure 36 (KIRKNESS *et al.* 2003). Nous avons pu observer une série de signaux de polyadénylation AATTAAA, surlignés de rouge dans la Figure 35. L'anticodon de l'ARN de transfert (TTG) est en rouge et suggère que l'ARN de transfert originel serait l'ARNt^{Glu}.

Finalement, nous avons aligné l'ensemble des séquences SINE du promoteur *MITF-M*, amplifiées chez nos chiens de la famille-panel. Le résultat de cet alignement est représenté Figure 36. Les bornes du SINE, correspondant à la séquence génomique du promoteur, sont en rouge.

Nous avons constaté un alignement parfait, à la base près, de la séquence amplifiée du SINE du bull terrier, des dalmatiens 69 et 83 ainsi que de l'ensemble des membres de la famille-panel (Figure 36). Pour un seul des chiots de la portée, le n°87, une adénine supplémentaire a été observé en fin de queue poly(dA). Une ré-amplification du SINE pour cette femelle entendante suivie d'un re-séquençage serait nécessaire pour confirmer qu'il s'agit d'un vrai polymorphisme et non pas d'une erreur technique (étape de la polymérisation ou du séquençage).

Figure 36 : Alignement nucléotidique des amplicons contenant le SINE obtenus chez les dalmatiens de la famille testée

CLUSTAL W (1.83) Alignement multiple : SINE promoteur MITF

```

BullTerrier-EB      TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-69    TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-S-83     TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-M33   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-P66   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-S-c94    TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EU-c93   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EU-c92   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-c91   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EU-c90   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-c88   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-c86   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-c85   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
Dalmatien-EB-c87   TTAAGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTAGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCC 60
*****

BullTerrier-EB      TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-69    TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-S-83     TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-M33   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-P66   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-S-c94    TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EU-c93   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EU-c92   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-c91   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EU-c90   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-c88   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-c86   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-c85   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
Dalmatien-EB-c87   TGGAGACCAGGGATCGAATCCCACGTCGGGCTCCCAAGTGCATGGAGCCTGCTTCTCCCTC 120
*****

BullTerrier-EB      TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-69    TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-S-83     TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-M33   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-P66   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-S-c94    TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EU-c93   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EU-c92   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-c91   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EU-c90   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-c88   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-c86   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-c85   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
Dalmatien-EB-c87   TGCCTATGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGAATATCATAAAATAAATAA 180
*****

BullTerrier-EB      ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-69    ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-S-83     ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-M33   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-P66   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-S-c94    ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EU-c93   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EU-c92   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-c91   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EU-c90   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-c88   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-c86   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-c85   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 208
Dalmatien-EB-c87   ATAAAATAAAAAGAAAAAA--AATTGT 209
*****

```

Légende : les séquences du SINE amplifié chez un bull terrier entendant bilatéral (EB), 7 dalmatiens entendants bilatéraux, 3 dalmatiens entendant unilatéraux (EU) et 2 dalmatiens sourds (S) sont identiques à la base près. Pour un seul dalmatien EB (c87), une désoxyadénosine (A) supplémentaire est présentée en position 203, sans signification fonctionnelle.

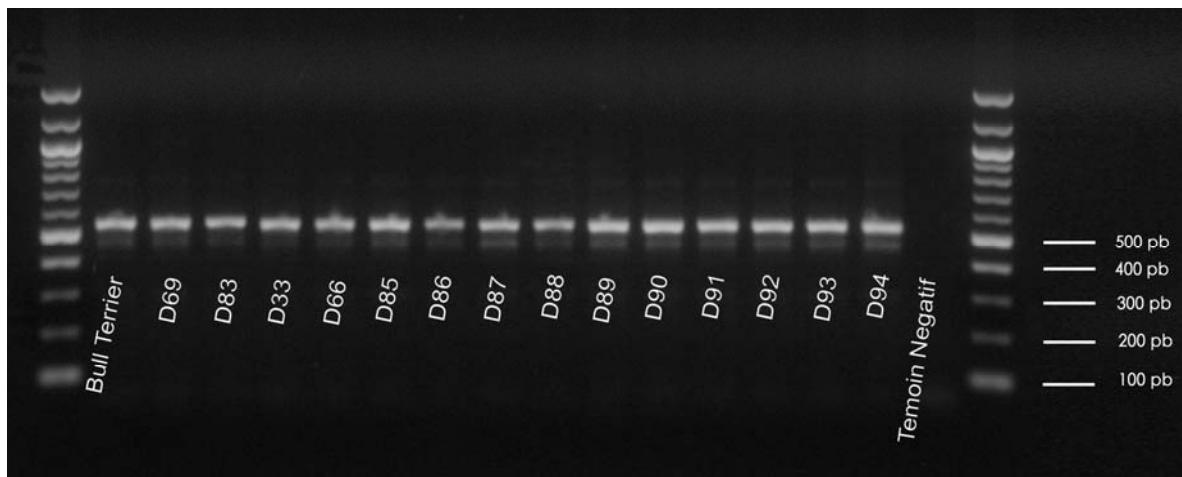
Au bilan, nous avons validé toutes les étapes techniques permettant d'analyser l'implication éventuelle du SINE, en tant que polymorphisme, dans la variabilité phénotypique observée chez les dalmatiens de notre famille-panel. Nous avons retrouvé chez les dalmatiens en provenance d'élevages français la même séquence que chez les dalmatiens américains, ce qui plaide en faveur d'une proximité génétique des 2 groupes d'animaux. Les flux de reproducteurs entre les 2 continents sont connus et corroborent l'hypothèse de 2 populations au moins partiellement mêlées. De plus, la présence chez le bull terrier testé d'un SINE exactement identique à celui des dalmatiens, est pour le moins surprenante. En effet, une étude à large échelle sur des labradors atteints de myopathie centronucléaire et provenant de 4 pays différents, a montré que le SINE associé à cette maladie pouvait diverger de plusieurs paires de bases entre individus, à l'intérieur même de la race (L. TIRET, données personnelles). Le résultat que nous avons obtenu entre bull terrier et dalmatiens suggère donc que cet allèle a été échangé très récemment entre ces deux races, peut-être par un phénomène de retrempe qu'il conviendrait de vérifier avec les clubs de race. Alternativement, on peut aussi envisager une autre explication qui reposerait sur une grande stabilité de la séquence du SINE inséré dans le promoteur *MITF-M*. Ces deux hypothèses pourraient être étudiées en augmentant le nombre d'animaux analysés et en élargissant leur lieu de provenance.

Enfin, l'absence de toute variation dans la longueur et la composition de la séquence du SINE chez tous les individus de la famille-panel, ainsi que chez les 2 dalmatiens plus éloignés, nous permet de conclure que ce SINE, non polymorphe à l'intérieur du groupe testé, ne peut à lui seul supporter la variabilité observée dans la couleur des yeux, la présence de patchs à la naissance ou le fait, pour un chiot dalmatien, de ne pas développer son sens de l'audition dans l'une ou les deux oreilles.

➤ Analyse du polymorphisme de longueur en position -91

Afin de vérifier si des variations de cette séquence pouvaient être associées à la couleur des yeux, à la présence de patchs ou au développement de l'oreille interne, nous avons amplifié le polymorphisme de longueur du promoteur *MITF-M* chez l'ensemble des individus de notre famille-panel (Figure 37). Les chiens étaient un bull terrier (piste 2), les dalmatiens n° 69 et 83 (pistes 3 et 4), la mère et le père de notre famille-panel (pistes 5 et 6) et les 10 chiots par ordre croissant de leur n° (pistes 7 à 16). La piste 17 correspondait au contrôle négatif. Les pistes 1 et 18 correspondaient au marqueur de poids moléculaire. L'amplification a permis de révéler un seul amplicon par animal à cette résolution d'électrophorèse, compatible avec la taille attendue de 500 paires de bases.

Figure 37 : Electrophorèse en gel d'agarose des amplicons contenant le polymorphisme de longueur du promoteur *MITF-M*, obtenus à partir d'un panel représentatif de dalmatiens



Légende : Photo du gel d'agarose après migration des produits de la PCR du polymorphisme de longueur.

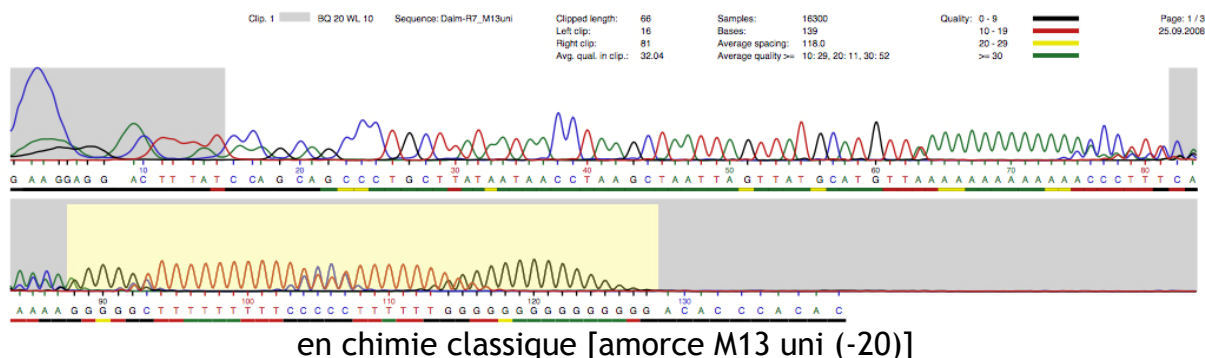
Les pistes 1 et 18 correspondent au marqueur de poids moléculaire. La piste 1 est un témoin de race différente du dalmatien contenant à priori une séquence SINE.

Les pistes notées D69, D83, D33, D66, et les pistes D85 à D94 correspondent aux dalmatiens 69, 83, 33, 66 et 85 à 94 de notre pedigree.

La piste 17 est un témoin négatif.

Nous avons alors envoyé ces amplicons à la séquence. Les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants, ainsi que l'atteste un exemple de chromatogramme (Figure 38).

Figure 38 : Chromatogramme représentatif de la séquence incluant le polymorphisme de longueur (chiot n°86), obtenue à partir des amplicons séquencés



Légende : La séquence de l'amplicon est lue à partir de l'amorce à cheval sur l'exon 1 du gène MITF-M (Figure 23, right primer). Elle est ici présentée en lecture anti-parallèle. On lit donc ici de gauche à droite sur le brin complémentaire pour obtenir la séquence du polymorphisme de longueur indiquée figure 23. La séquence est lue sans difficulté jusqu'à la répétition des désoxyadénosines (polyA) puis devient illisible du fait de pics chevauchants.

Pour toutes les séquences, nous avons eu le même type de difficulté technique lors de l'étape de séquençage : l'enzyme de séquençage n'est pas parvenu à lire au delà de la longue série de répétitions d'oligo(dA), d'oligo(dT) puis oligo(dG). Même si des pics donnaient aux chromatogrammes une allure de séquence lue, la qualité était en réalité très médiocre ; une majorité de bases ont été lues avec une valeur ≤ 19 , elles sont soulignées d'un trait rouge ou noir dans la Figure 38. L'hypothèse la plus probable avancée pour expliquer ces mauvaises lectures était le décrochage de l'enzyme de séquençage en fin de répétitions. La société de séquençage MWGEurofins nous a alors suggéré de recommencer ces séquences en modifiant la chimie de séquençage et en abordant la zone des répétitions également par le brin complémentaire. Cela revenait à séquencer cette zone à partir des 2 amorces M13 et cMITF_Repetf. Nous avons donc relancé l'amplification de cette région répétée à partir de l'ADN d'un individu test, le chiot n°86, et avons renvoyé à la société MWGEurofins des amplicons obtenus. Les mises au point de leur côté ont été fastidieuses et longues. Au final, nous avons reçu les résultats qui sont présentés sur la Figure 39 (séquence obtenue à partir de l'amorce cMITF_Repetf) et la Figure 40 (séquence obtenue à partir de l'amorce M13).

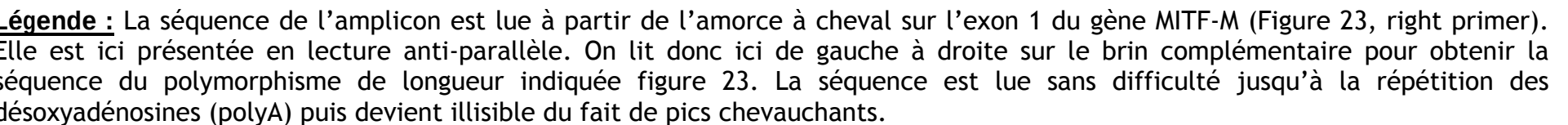
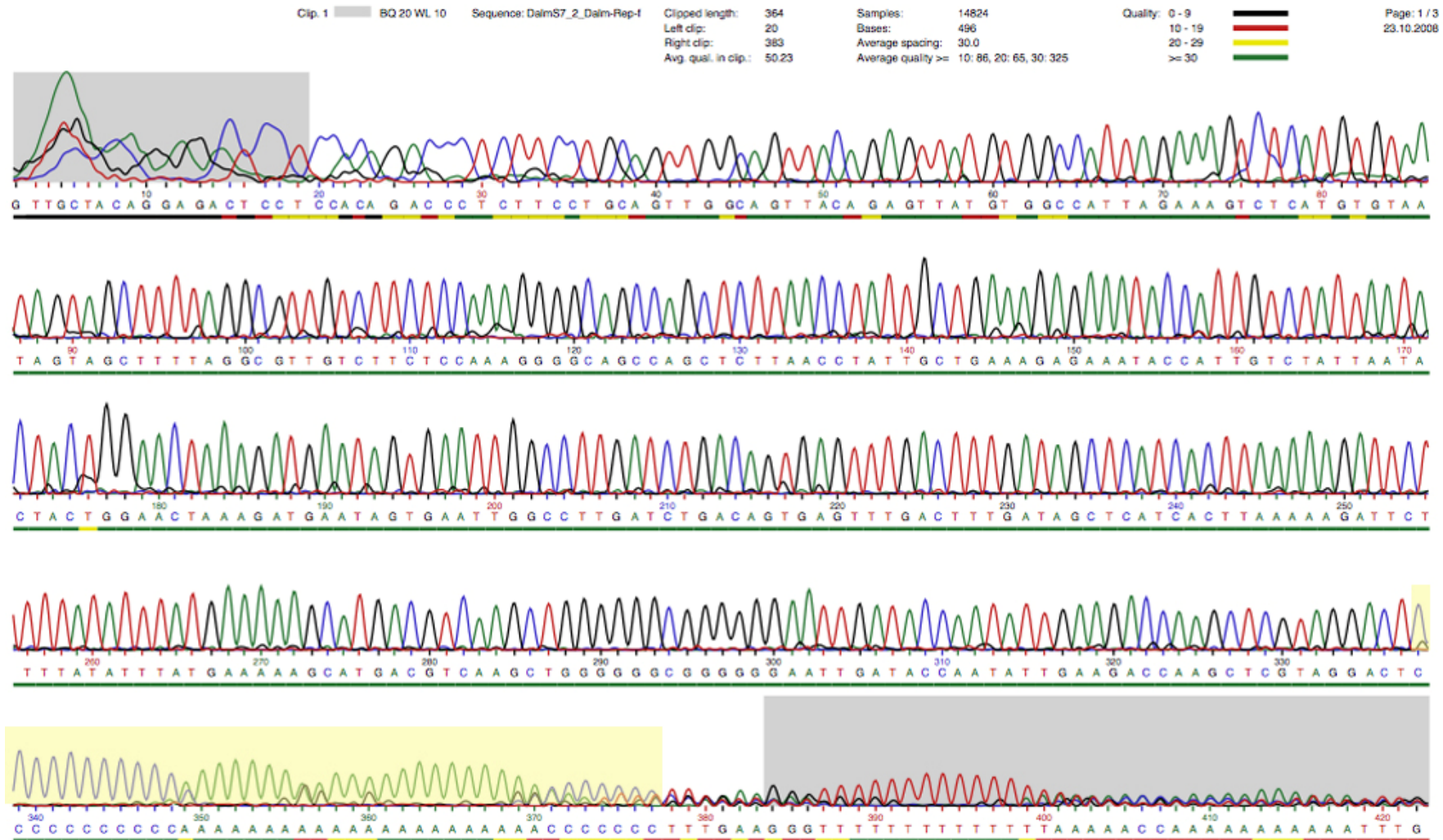


Figure 40 : Chromatogramme représentatif de la séquence incluant le polymorphisme de longueur (chiot n°86), obtenue à partir des amplicons séquencés en chimie modifiée [amorce M13 uni (-20)]



Légende : La séquence de l'amplicon est lue à partir de l'amorce du promoteur MITF-M (Figure 23, left primer). La séquence est lue sans difficulté jusqu'aux premières séries de répétitions puis devient illisible du fait de pics chevauchants. Les premières paires de bases soulignées d'un astérisque figure 23 sont ici encadrée pour permettre la comparaison des deux séquences.

L'analyse de la séquence cMITF_Repetf a permis de valider la qualité de nos PCRs ainsi que la bonne qualité technique du séquençage sur une grande partie de la séquence (Figure 39). Les 340 premières paires de bases de cette séquence, correspondant à la région 5' du polymorphisme de longueur du promoteur *MITF-M* (Figure 28), ont été alignées avec la séquence du promoteur reçue d'Elinor Karlsonn. Nous avons observé 100% de similitude sur les 323 paires de bases en 5' du polymorphisme de longueur (données non montrées), validant ainsi la faisabilité du séquençage via cette amorce et la fiabilité des enzymes utilisées dans les étapes d'amplification et de séquençage. Malheureusement, la séquence du polymorphisme de longueur n'a pu être obtenue avec une qualité élevée, ainsi que l'attestent les codes couleur sous chacune des bases (zones avec un arrière-plan jaune sur la Figure 39). En conséquence, nous n'avons pu interpréter aucune des 2 séquences obtenues à partir des 2 amorces cMITF_Repetf et M13 pour la région du polymorphisme de longueur (zones avec un arrière-plan jaune sur les Figures 39 et 40). Afin de vérifier que nous étions confrontés à un problème technique de séquençage, nous avons extrait des 3 séquences reçues du même chiot (correspondant aux Figures 38, 39 et 40), la région du polymorphisme de longueur pour chacune d'elle et les avons alignées (Figure 41). L'alignement produit a démontré que pour un même ADN, celui du chiot n°86, nous avons obtenu 3 séquences différentes pour le polymorphisme de longueur (arrière-plan jaune sur la figure 41) avec les 3 conditions de séquençage utilisées. Une interférence d'origine technique ne nous a donc pas permis de conclure sur la composition et la longueur exacte du polymorphisme dans cette région du promoteur *MITF-M*, et la question de son implication dans la variabilité phénotypique des animaux testés demeure sans réponse à ce jour.

Figure 41 : Alignement nucléotidique partiel des 3 séquences obtenues à partir de l'amplification du polymorphisme de longueur du chiot n°86

```
SeqRep-86_1_M13  GTGTCCCCCCCCCCCCCAAAAAA-GGGGGAAAAAAAAAGCCCCCTTTTGAAGGGTT
SeqRep-86_2_M13  GGGGCCCCCCCCCCCCCAAAAAAAGGAAAAAAAAAAAAACCCCTGTTTGAAGGGTT
SeqRep-86_2_SINEf GACT----CCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCTTTGAAGGGTTT
*                ***** *      ***** ***** ** *
```

Légende : Trois séquences d'un même chiot obtenues par des expériences distinctes ne s'alignent pas à 100% et démontrent qu'une variabilité inter-expériences doit être résolue. Alternativement, une hétérozygotie des séquences d'origine peut expliquer la non reproductibilité des expériences.

Cette dernière série d'expériences permet de souligner, en dépit de la standardisation de ces techniques devenues routinières dans les laboratoires, la difficulté sous-jacente de l'amplification et du séquençage de l'ADN. Ainsi, on s'aperçoit que les enzymes ont parfaitement amplifié et séquencé une première répétition d'oligo(dA) mais ont buté sur les répétitions suivantes (Figures 38 et 39).

Dans un autre contexte génomique, ces mêmes enzymes ont parfaitement fonctionné sur une zone à forte densité de séquences répétées (voir dernière ligne avec arrière-plan jaune de la Figure 34). Dans notre étude, l'échec de séquençage du polymorphisme de longueur ne semblerait pas provenir de la structure spécifique de l'ADN, particulièrement contrainte par des séquences répétées, car la chimie utilisée lors de la seconde série permet de s'en affranchir en grande partie. Nous devons donc imaginer que l'impossibilité de séquencer cette région tient à ce que chaque série d'amplicons que nous avons envoyée était, en réalité, un mélange de séquences décalées de quelques paires de bases, produisant une séquence totale ininterprétable. En d'autres termes, chacun des animaux contiendrait deux allèles différents de la même région. Cette hypothèse, qui doit être vérifiée, redonnerait du sens à la question d'une association possible entre ce polymorphisme génétique et la variabilité phénotypique observée chez nos dalmatiens. La vérification de cette hypothèse passera par le clonage plasmidique des amplicons obtenus et le séquençage de plusieurs de ces clones par individu. Ainsi, nous nous affranchirons de la mosaïque de séquences qui a semblé poser problème en séquençant chaque clone indépendamment, nous pourrions identifier pour chaque individu son ou ses 2 allèle(s) et nous établirons s'il existe une ou des combinaison(s) allélique(s) qui co-ségrégeraient avec les caractères phénotypiques d'intérêt. Cette série d'expériences, longue et fastidieuse, n'a malheureusement pu être réalisée dans le cadre de cette thèse.

CONCLUSION

En Europe et aux Etats-Unis, la surdité est une préoccupation majeure pour les éleveurs et propriétaires de dalmatiens. Malgré les mesures entreprises de longue date par les clubs de race dans les différents pays, sa prévalence reste de l'ordre de 20%. Seul un test génétique, permettant la détection des porteurs sains des allèles de morbidité, offrira une amélioration dans la lutte contre la surdité.

La réalisation d'un tel test nécessite de connaître le mode de transmission de l'affection. Afin d'y parvenir, nous avons reçu l'aide du Club Français des dalmatiens et constitué un pedigree d'une centaine de chiens. Pour une majorité d'entre eux, de l'ADN génomique individuel a pu être extrait.

L'analyse de ce pedigree nous a permis de conclure à une transmission gouvernée par un gène autosomique récessif majeur, et à une expressivité variable, certainement due à la présence de gènes modificateurs. Ceci est en accord avec le résultat d'études préalablement réalisées sur des populations de dalmatiens élevés aux Etats-Unis.

Les travaux de recherche réalisés par KARLSSON en 2007 (KARLSSON *et al.*, 2007) nous ont amenés à penser que des allèles du gène *MITF* pourraient être de bons candidats moléculaires pour expliquer la contribution autosomique récessive majeure de cette affection. En effet, deux régions polymorphes du promoteur codant pour le transcrit mélanocytaire du gène *MITF* ont été associées à la couleur blanche chez le bull terrier et le boxer. Le premier consiste en une insertion d'un élément SINE, retrouvée chez le dalmatien. Le second consiste en un polymorphisme de longueur. Une relation entre robe blanche et surdité étant depuis longtemps reconnue dans de nombreuses espèces, nous avons souhaité étudier si des variations particulières de séquences dans ces régions polymorphes pouvaient être associées à la surdité chez le dalmatien.

Nous avons donc réuni un pedigree de 93 dalmatiens parmi lesquels des cas de déficit auditif unilatéral et bilatéral ont été clairement caractérisés. Nous avons également repéré la séquence promotrice du transcrit *MITF-M* chez ces chiens, après avoir identifié une erreur d'annotation de la séquence génomique de référence chez le Chien dans la région du SINE. Cette erreur est consécutive au fait que l'animal ayant permis de réaliser cette séquence de référence était hétérozygote pour le SINE, ce qui a produit des anomalies de séquences.

La comparaison des amplicons obtenus chez des dalmatiens entendants et sourds n'a pas révélé de différence de séquence dans la région du SINE entre eux. Tous les individus étaient homozygotes pour l'insertion, dont la longueur n'est pas modifiée en fonction du statut clinique.

L'analyse des amplicons du polymorphisme de longueur par électrophorèse n'a pas non plus montré de différence entre dalmatiens entendants et sourds. En revanche, l'analyse précise des séquences n'a pu être réalisée en raison de difficultés techniques liées à la structure même de la séquence dans cette région. L'hypothèse d'hétérozygotie pour chacun des individus n'a pu être écartée et demeure plausible. En ce cas, il est possible que des allèles distincts soient différentiellement hérités par les chiots, leur conférant un statut clinique particulier vis à vis de la surdité. Cette démonstration passera par la reprise des expériences et le clonage individuel des allèles afin de permettre l'établissement précis de leur séquence, à la base près.

BIBLIOGRAPHIE

- ALHAIDARI Z., OLIVRY T. et ORTONNE J-P., Melanocytogenesis and melanogenesis : genetic regulation and comparative clinical diseases. *Veterinary Dermatology*. 1999 3-16
- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J. *et al.*, Cellules différenciées et conservation des tissus. In : *Biologie Moléculaire de la Cellule*. 3rd ed.. Paris : FLAMMARION, 2000, 1142
- AUBIN G., Les gènes de pigmentation chez la Souris. Thèse Méd. Vét., Alfort, 135p 1997
- BENEDITO E, JIMENEZ-CERVANTES C, PEREZ D, CUBILLANA J.D, SOLANOF, JIMENEZ-CERVANTES J *et al.*, Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. Jul 1997 19 1336(1) : 59-72.
- BENNETT D.C. et LAMOREUX M.L., The color loci of mice - A genetic century. *Pigment Cell Res.* 2003 16 : 333-344
- BERTOLOTTO C., ABBE P., HEMESATH T.J., BILLE K., FISHER D.E., ORTONNE J-P. et BALLOTTI R., Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *The journal of cell biology*. Aug 1998 10 142(3) : 827-35
- BOUCHARD B., Le développement embryonnaire du système mélanocytaire et sa pathologie. *Med. Science* 1993 9 : 425-430
- BOISSY R.E. et NORDLUND J.J., Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Rev*. Feb-Apr 1997 10(1-2) : 12-24
- BRANIS M. et BURDA J., Inner ear structure in the deaf and normally hearing Dalmatian dog. *Comp. Path.* Apr 1985 95(2) : 295-9.
- BUSH W.B. et SIMON J.D., Quantification of Ca(2+) binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell research*. Avril 2007 20(2) : 134-9
- CARGILL E., FAMULA T., STRAIN et MURPHY K., Heritability and segregation analysis of deafness in U.S. Dalmatians. *Genetics*. Mar 2004 166(3) : 1385-93
- CLARK LA, WAHL JM, REES CA et MURPHY KE., Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 2006 103(5) : 1376-81.
- COULOIGNER V., TEIXEIRA M., STERKERS O., RASK-ANDERSEN H., FERRARY E., Le sac endolymphatique : ses fonctions au sein de l'oreille interne. *Medicine Science*. 2004 20(3) : 304-310
- DEBRAUWERE H., GENDREL C.G., LECHAT S. et DUTREIX M., Differences and similarities between various tandem repeat sequences : minisatellites and microsatellites. *Biochimie*, Oct 1997, 79(9-10) : 577-86

DE CHEVEIGNE A., Modèles de traitement auditif dans le domaine temps. Mémoire d'habilitation à diriger des recherches (Neurosciences), Université Paris 6, 142p 2000

DJIAN-ZAOUCHÉ J., Etude du contrôle de l'homéostasie des cellules souches de mélanocytes chez la souris. Thèse de Doctorat Université Pierre et Marie Curie, 110p 2008

EVANS H.E., Miller's anatomy of the dog, 3ème édition, The ear., Philadelphia, 1993, 988-1008

FAMULA T., OBERBAUER A. et SOUSA C., Complex segregation analysis of deafness in dalmatians. American Journal of Veterinary Research. May 2000 61(5) : 550-3

FAMULA T., OBERBAUER A. et WILLIAMS D., Gender effects in hearing loss in Dalmatians. Preventive Veterinary Medicine. Jan 2001 17 48(1) : 15-24

GODING C.R., *Mitf* from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. Genes and development. Jul 2000 15 14(14) : 1712-28

HOLLIDAY T., NELSON H., WILLIAMS C. et WILLITS N., Unilateral and bilateral brainstem auditory-evoked response abnormalities in 900 Dalmatian dogs. Journal of veterinary Internal medicine. May-Jun 1992 6(3) : 166-74

HORNYAK T.J., HAYES D.J., CHIU L.Y. et ZIFF E.B., Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and *Mitf*. Mechanisms of development. Mar 2001 101(1-2) : 47-59

KARLSSON E.K. et LINDBLAD-TOH K., Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. Nat Rev Genet. Sep 2008 9(9) : 713-25

KARLSSON E.K., BARANOWSKA I., WADE C.M., SALMON HILLBERTZ N.H., ZODY M.C., ANDERSON N. *et al.*, Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. Nature genetics. Nov 2007 39(11) : 1321-8

KIRKNESS E.F., BAFNA V., HALPERN A.L., LEVY S., REMINGTON K., RUSCH D.B. *et al.*, The dog genome : survey sequencing and comparative analysis. Science. Sep 2003 26;301(5641) : 1898-903.

KRIEGER N., Intérêt des outils moléculaires dans le diagnostic des maladies tropicales transmises par les tiques, Thèse Méd. Vét. Lyon, 1999, n° 34, 156p.

LEEGWATER P.A., VAN HAGEN M.A. et VAN OOST B.A., Localization of white spotting locus in boxer dogs on CFA20 by genome-wide linkage analysis with 1500 SNPs. J Hered. 2007 98(5) : 549-52.

LEWIN H.A. et STEWART-HAYNES J.A., A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. Biotechniques. Oct 1992 13 (4) : 522-4

LIN J.Y. et FISHER D.E., Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature. Feb 2007 22 445(7130) : 843-50

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. dec 2005 8 438(7069) : 803-19

LITTLE C.C., The inheritance of coat color in dogs, Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY. 1957.

- MEYER ZUM GOTTESBERGE A.M., Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. *Pigment Cell Res.* 1988 1(4) : 238-49
- MOORE K.J., Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet.* 1995 11 442-8
- MUHLE A., JAGGY A., STRICKER C., STEFFEN F., DOLF G., BUSATO A. *et al.*, Further contributions to the genetic aspect of congenital sensorineural deafness in Dalmatians. *The Veterinary Journal.* May 2002 163(3) : 311-8
- NIPARKO J.K. *et* FINGER P.A., Cochlear nucleus cell size changes in the dalmatian : model of congenital deafness. *Otolaryngol head Neck Surg.* Sept 1997 117(3 Pt 1) : 229-35
- PELÉ M., TIRET L., KESSLER J.L., BLOT S. *et* PANTHIER J.J., SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum Mol Genet.* Jun 2005 14(11) : 1417-27
- PETERS T.A., KUIJPERS W., TONNAER E.L.G.M., VAN MUIJEN G.N.P. *et* JAP P.H.K., Distribution and features of melanocytes during inner ear development in pigmented and albino rats. *Hearing Research.* May 1995 85(1-2) : 169-80
- PETTON R., La surdité du dalmatien. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2002, 67p
- PONCELET L., DELTENRE P., COPPENS A., MICHAUX. *et* COUSSART, Brainstem auditory potential evoked by clicks in the presence of high-pass filtered noise in dogs. *Research in Veterinary Science.* Apr 2006 80(2) : 167-74
- PRESSNITZER D., L'organisation des sons, de l'illusion à la perception. *Pour la Science.* Nov 2008 373 : 116-123
- ROTHSCHILD M.F., VAN CLEAVE P.S., GLENN K.L., CARLSTROM L.P. *et* ELLINWOOD N.M., Association of *MITF* with white spotting in Beagle crosses and Newfoundland dogs. *Anime Genet.* Dec 2006 37(6) : 606-7
- SIMEON L. *et* MONNEREAU L., Diagnostic de la surdité : les PEA. *Point vétérinaire* Oct 2005 36 / 12-13
- STEEL K.P. and BARKWAY C., Another role for melanocytes their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development.* Nov 1989 107(3) : 453-63
- STEINGRIMSSON E., MOORE K.J., LAMOREUX M.L., FERRE-D'AMARE A.R., BURLEY S.K., SANDERS ZIMRING D.C. *et al.*, A Molecular basis of mouse microphthalmia mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nature Genetics.* Nov 1994 8(3) : 256-63
- STRAIN G., KEARNEY M., GIGNAC I., LEVESQUE D., NELSON H., TEDFORD B. *et* REMSEN L., Brainstem auditory-evoked potential assessment of congenital deafness in Dalmatians associations with phenotypic markers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* May-Jun 1992 6(3) : 175-82
- STRAIN G., Congenital Deafness and its Recognition. *Vet Clin North Am. Small Anim. Parct.* Jul 1999 29(4) : 895-907
- STRAIN G., Deafness prevalence and pigmentation and gender associations in dog breeds at risk. *The veterinary journal.* Jan 2004 167(1) : 23-32

- SUTTER N.B. et OSTRANDER E.A., Dog star rising : the canine genetic system. Nat. Rev. Genet. Dec 2004 5(12) : 900-10
- TASSABEHJI M., NEWTON V.E. et READ A.P., Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia gene. Nature genetics. Nov 1994 8(3) : 251-5
- TSUCHIDA S., TAKIZAWA T., ABE K., OKAMOTO M. et TAGAWA, Identification of microphthalmia-associated transcription factor isoforms in dogs. Vet J. aug 2008
- WELLBROCK C., RANA S., PATERSON H., PICKERSGILL H., BRUMMELKAMP T. et MARAIS R., Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor *MITF*. PloS ONE. Jul 2008 16 3(7) : e2734
- WIDLUND H.R. et FISHER D.E., Microphthalmia-associated transcription factor : a critical regulator of pigment cell development and survival. Oncogene. May 2003 19 22(20) : 3035-41
- WOOD J. et LAKHANI K., Deafness in Dalmatian : does sex matter ?. Preventive Veterinary Medicine. 1998 36 : 39650
- WOOD J. et LAKHANI K., Prevalence and prevention of deafness in the dalmatian - Assessing the effect of parental hearing status and gender using ordinary logistic and generalized random litter effect models. The Veterinary Journal. Sept 1997 154(2) : 121-33

Ressources Internet :

ANTAGENE, site du Laboratoire Antagene [en ligne], Mis à jour en 2007, [<http://www.antagene.com>], (consulté en avril 2008)

BIRNEY E. and HUBBARD T., The Ensembl Project [en ligne], Mise à jour N°49 de mars 2008 [<http://www.ensembl.org>], (consulté en avril 2008)

EUROFINS MWG OPERON, site de la Compagnie Eurofins MWG Operon, [en ligne], Mis à jour en 2008 [<http://www.eurofinsdna.com>], (consulté en avril 2008)

JOLY N., LEDONTAL C. et la Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale, Mobyle Project Website [en ligne], [<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py>], (consulté en avril 2008)

LAVIGNE-REBILLARD, Site de l'Institut Universitaire de Recherche Clinique [en ligne], Mise à jour en 2007 [<http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric51/audition/francais/cochlea/stria/stria.htm>], (consulté en février 2008)

Mouse Genome Database (MGD), site de Mouse Genome Informatics The Jackson Laboratory [en ligne], Mise à jour en 2008 [<http://www.informatics.jax.org>], (consulté en janvier 2009)

N.C.B.I., site de la U.S. National Library of Medicine [en ligne], Mise à jour le 15 octobre 2006 [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>], (consulté en avril 2008)

ROZEN S. and SKALETSKY H., Primer3 [en ligne], Mise à jour 14 mars 2007 [<http://frodo.wi.mit.edu>], (consulté en avril 2008)

The Swiss Virtual Campus, Site des Universités de Fribourg, Lausanne et Berne (Suisse) [en ligne], Mise à jour le 9 mai 2006 [<http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html>], (consulté le 25 février 2008)

ANALYSE GENETIQUE DE LA SURDITE DU DALMATIEN

NOM et Prénom : BERENBAUM Lucille

Résumé :

Avec une prévalence proche de 20%, le déficit auditif du chiot dalmatien constitue un enjeu médical majeur pour la filière. Comme dans beaucoup d'autres espèces, cette surdité est liée à la robe largement dépigmentée du dalmatien, témoin d'une anomalie globale de la mélanogenèse dont un des effets invisibles est la dégénérescence de l'appareil endocochléaire. Cette surdité congénitale est héréditaire et sa disparition passera nécessairement par l'utilisation de reproducteurs indemnes des allèles de prédisposition. Depuis des décennies, les efforts de sélection portant sur le diagnostic physique des animaux ont échoué. Les outils de la génomique contemporaine permettent d'espérer la mise au point d'un test d'identification génétique fiable. Le préalable à l'utilisation zootechnique de ce test est l'identification des polymorphismes génomiques associés à la survenue de la surdité. Les gènes régulateurs de la cascade génétique du contrôle de la pigmentation sont de bons candidats et deux polymorphismes dans la séquence promotrice de l'un d'eux, *MITF*, ont récemment été associés à la couleur blanche chez le boxer et le bull terrier.

Notre travail a visé à confirmer ou infirmer l'association de ces polymorphismes avec la surdité chez les dalmatiens en provenance d'élevages français. Avec l'aide d'un club de race et d'éleveurs consentants, nous avons réuni un pedigree de 93 chiens comportant 18 chiots frappés de déficit auditif et obtenu l'ADN pour 84 d'entre eux. Nous avons établi que le mode de transmission de cette surdité est compatible avec un caractère autosomique récessif à expressivité variable. Sur cette base, nous avons écarté l'association d'un des deux polymorphismes avec la surdité et n'avons pu, pour des raisons techniques, conclure pour le second.

Mots-clés :

GENETIQUE, AUDITION, SURDITE, POTENTIEL EVOQUE AUDITIF, MELANOCYTOGENESE, PCR, SNP, ANALYSE D'ASSOCIATION, CARNIVORE, RACE CANINE, CHIEN, DALMATIEN.

Jury :

Président Pr

Directeur Dr TIRET

Assesseur Dr ABITBOL

Adresse de l'auteur :

Lucille BERENBAUM

6, rue du Pré au Foin

61700 DOMFRONT

GENETIC ANALYSIS OF DEAFNESS IN DALMATIAN DOG

SURNAME and Given name : BERENBAUM Lucille

Summary :

Auditory deficiency in dalmatian pups reaches a prevalence of 20% and is therefore a major health concern for dalmatian breeders. The pathophysiological mechanism leading to deafness includes the loss of melanin production by cochlear cells and explains why, in dalmatians as well as in many other species, deafness could be historically linked to inherited coat color and melanogenesis defects. A reduction of the disease prevalence in the breed will require to selectively use studs and dams cleared for the specific at-risk alleles. For decades, only phenotypic markers have been used and failed to produce any significant decrease in the number of affected pups. Thus, a genetic test is mandatory and in order to achieve this goal, the genomic causal mutation needs to be identified. Among the different genes involved in pigmentation, *MITF* plays a key role and appeared thus as a good candidate. Indeed, two polymorphisms in its promoter have been associated with the white-coat color in boxers and bull terriers.

OBJECTIVES : Our first goal was to establish the mode of inheritance of deafness in french dalmatians and then to search for a compatible association between deafness and inheritance of the two allelic polymorphisms identified in the *MITF* promoter region.

METHODS : We used a pedigree of 93 related dalmatians that included 18 pups with hearing impairment and compared the two polymorphic genomic sequences of the *MITF* promoter between hearing and deaf dogs.

RESULTS : Segregation of deafness was compatible with an autosomal recessive mode of inheritance with variable expressivity. One of the amplified polymorphism could be excluded as a candidate recessive disease-causing region and due to technical problems, we could not conclude for the second one.

Key words :

GENETIC, AUDITORY, DEAFNESS, BRAIN AUDITORY EVOKED REFLEX, MELANOCYTOGENESIS, PCR, SNP, ASSOCIATION ANALYSIS, CARNIVOROUS, CANINE BREED, DOG, DALMATIAN.

Jury :

Président Pr

Directeur Dr TIRET

Assesseur Dr ABITBOL

Author's Address :

Lucille BERENBAUM

6, rue du Pré au Foin

61700 DOMFRONT