# Le projet Génome du lycée Marcelin Berthelot : Bilan 2018

Génome à l'Ecole est une opération pilotée par Sciences à l'Ecole (http://www.sciencesalecole.org)

En partenariat avec le Génoscope, l'Ecole de l'ADN, l'INRA d'Orléans et l'URGV

# Projet Bretonne Pie Noir : volet « robe », élèves de BCPST 2016-2018

La robe est la couleur du pelage de la vache ; ici un veau BPN gris (« glazik ») de l'élevage d'Alain Divo.

**Enseignants** : Vincent Lun, Yann Esnault

**Elèves 2016 :** Morgane Bastide, Léa Bion, BOISSEAU Eléonore Boisseau, Augustin Isaac, Coline Marguet, Christelle Nivoix, Montaine Peson, Flora Sangouard (BCPST1B) ; Mado Abraham, Amaury Aubel, Mathilde Decuyper, Clélia Giraudot, Marie Perruchot, Quentin Reynard-Feytis, Juliette Simon, Flavie Thévenard (BCPST1C)

**Elèves 2017 :** Camille Blondeau, Quentin Capillon, Arthur Compte, Elise Grimbert, Margot Haguet, Hortense Hélier, Alex et Rémi Lefebvre, Yann Moreno, Bérénice Mouzé, Marie Nguyen, Pauline Turk, Marie Vallée (BCPST1C)

**Elèves 2018** : Laura Mieli, Celia Le Roux, Guillaume Chapelet, Léna Carnet, Solène Bonnet, Anaïs Ingelet, Maryame Diakite, Thomas Mouthon, Agathe Huet, Clémence Blancard, Léa Jaouen (BCPST1B) ; Niels André, Clément Bienvenu, Emilie Cantin, Marianne Cerf, Julia Chapelain, Aurélie Costes, Marie Joigneau, Maud Lagier, Alizé Le Carvèze, Laure Le Labousse, Emilie Meynaud, Lucie Poujol (BCPST1C)

**Séances 2018** : échantillonnage (27 janvier), extraction de l'ADN (3h, 5 et 17 mars), amplification (2h, 19 et 31 mars), analyse des séquences (2h, 28 juin)

# Projet Bretonne Pie Noir : volet « culard », élèves de première S 2018

A gauche, Chopin, première vache culard décrite chez la Bretonne Pie Noir.

Analyse des séquences avec les enseignants et les élèves de BCPST et de première S le 28 juin 2018.

**Enseignants** : Caroline Nedellec, Aurélien Terracol

**Elèves** : 20 élèves, dans deux classes de première S : Garance Coulon, Alice Bloc, Thomas Brunehaut, Erin Preichert, Juliette Lamotte, Eden Hurtebis, Héloïse Bares, Marie Dubromel, Sarah Margarido…

**Séances** : échantillonnage (27 janvier), extraction de l'ADN (3h, 7, 20 et 21 mars), amplification (3h, 10 et 28 mars), analyse des séquences (2h, 28 juin)

# L’élevage d’Alain Divo

Alain Divo, à Fontenay-lès-Briis (Essonne), élève des **vaches Bretonne Pie Noir (BPN).** A la belle saison, les animaux sont loués par les collectivités locales pour faire de l’écopaturage dans les espaces verts d’Ile de France ; nous les avons trouvés à l’étable en janvier.

Pour ses vaches, Alain Divo recherche des **robes inhabituelles**. Il a notamment de nombreux animaux BPN pie glazik (« dilués »), acquis dans d’autres élevage ou nés sur place, un taureau BPN pie rouge, et quelques Froment du Léon (autre race bretonne à petit effectif). Il a également vu la naissance d’une velle **culardе**, nommée Chopin.

# L'élevage d'Alain Divo : animaux prélevés en 2018

**Nous prélevons des poils** sur l'encolure des animaux. Il y a assez d'ADN dans les follicules pileux d'une touffe de poils pour permettre, après extraction, l'amplification de régions ciblées du génome (technique de la ***Polymerase Chain Reaction*** **– PCR**).

**Chopin** (à gauche : pie noir, et culardе)
et **Fleur** (à droite: pie glazik - chamoisé)

**Ignak** (pie noir) et son **veau** (pie glazik - chamoisé)
obtenu avec **Isidore**

# L'élevage d'Alain Divo : animaux prélevés en 2018

**Isidore** (pie glazik - gris)

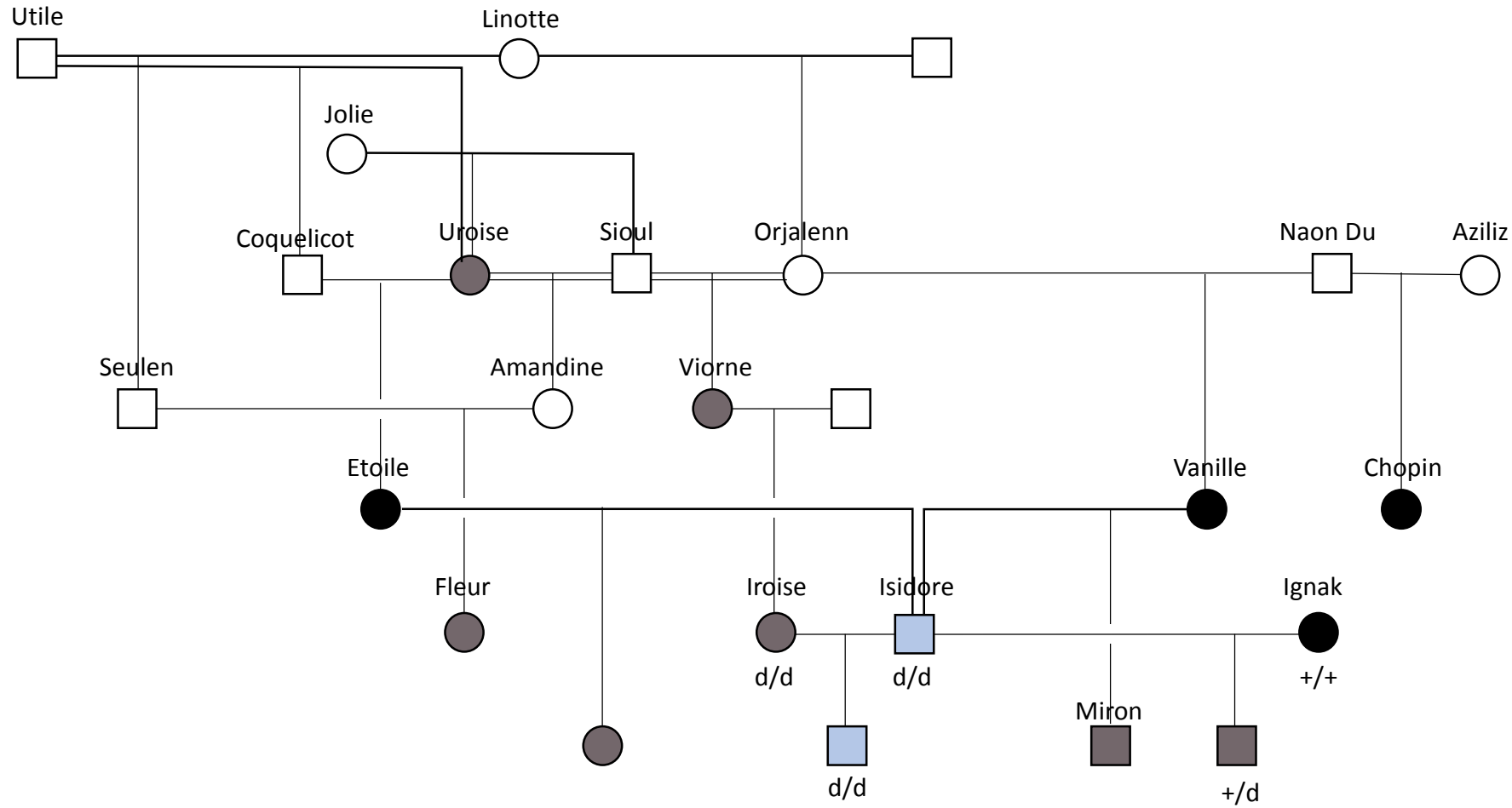
X

**Iroise** (pie glazik - chamoisé)

La couleur de robe évolue avec l'âge, elle fonce.

**Fils d'Isidore et d'Iroise**
(pie glazik – gris clair)

# Généalogie des animaux étudiés




Robe :

Noire (sauvage) — Diluée grise — Diluée chamoisée

Couleur de robe et génotype au locus *MLPH* sont indiqués lorsqu'ils sont connus.

# Nos résultats en très bref

La rare robe « rouge », chez la Bretonne pie noir, est associée à l'allèle $E^+$ du gène *MC1R*. La robe noire est due à l'allèle dominant $E^D$ comme chez les autres races noires.

La robe « glazik » (bleu grise ou chamoisée, « diluée ») n'est pas associée à *MC1R* : ces animaux peuvent être $E^D//E^D$ comme $E^D//E^+$.

La robe glazik semble associée à une délétion dans l'exon 2 du gène *MLPH*, comme c'est le cas chez la Blanc bleu belge.

Le phénotype culard, chez la Bretonne pie noir, est dû à un allèle (mutation non sens) jamais encore décrit dans le gène *MSTN*. L'individu chez qui cette mutation est apparue a été identifié.

# Volet « robe » : nos résultats en bref

## Gène *MC1R* (locus *Extension*), principal déterminant de la couleur de robe

- Les animaux BPN de **robe pie noir**, qu'elle soit **« diluée » ou non,** peuvent être hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle dominant $E^D$ au locus *Extension* (**$E^D//E^+$**, **$E^D//E^D$**). **Ce locus détermine la couleur noire de la robe, mais n'a donc pas de lien avec le caractère « dilué »**, comme cela était attendu.
- **Les animaux « rouges » sont $E^+//E^+$** (montré en 2017 sur un animal).
- L'ensemble de la séquence codante du gène *MC1R* (locus *Extension*) a été séquencé chez trois animaux dilués, **aucun nouveau polymorphisme n'a été découvert**. Les seuls allèles présents sont $E^D$ et $E^+$.

## Gènes candidats pour le caractère dilué : *KITLG*, *PMEL*, *TYRP1* et *MLPH*

- Après les gènes candidats *KITLG* et *PMEL*, testés et écartés en 2017, deux nouveaux gènes candidats pour le phénotype « dilué » ont été étudiés en 2018 : *TYRP1* (codant la protéine 1 associée à la tyrosinase) et *MLPH* (codant la protéine mélanophiline).
- Nous n'avons pas retrouvé chez les BPN « diluées » une substitution dans l'exon 7 de *TYRP1*, associée au phénotype « dun » dans la race Dexter (T.G. Berryere *et al.*, *Anim. Genet*. 2003).
- En revanche, nous avons retrouvé, chez 3 animaux BPN « dilués », une **délétion de 10 paires de bases dans le premier exon codant du gène *MLPH***, mutation disruptive déjà associée à une robe grise dans la race Blanc Bleu Belge (W. Li *et al.*, *Anim. Genet.* 2016).

# Volet « robe » : nos résultats en bref

- En résumé, nous proposons donc que **la robe « glazik » (= diluée), chez les Bretonnes Pie Noir de l'élevage d'Alain Divo, soit due à l'absence de protéine mélanophiline fonctionnelle** (animaux homozygotes pour la délétion dans le premier exon du gène *MLPH*). Ceci se traduirait par un défaut de distribution des mélanosomes contenant la mélanine le long des dendrites des mélanocytes. Il ne semble pas y avoir d'autres effets délétères de l'absence de cette protéine.
- **La délétion a-t-elle un effet à l'état hétérozygote ?** Le veau issu de l'union d'Isidore, dilué (del//del) et d'Ignak, non diluée (+//+), est dilué/chamoisé, et nécessairement de génotype (del//+). La mutation est donc **dominante**.
- La nuance de robe diluée, grise ou chamoisée (reflets bruns), doit s'expliquer par l'action d'un autre gène, plutôt que par un effet de dosage de la mélanophiline, car Isidore (gris), Iroise (chamoisée) et leur fils (gris) sont tous les trois homozygotes pour la délétion. Tout n'est donc pas élucidé et davantage d'animaux devront être génotypés.
- Il serait intéressant d'observer l'effet de ce défaut de mélanophiline dans le contexte d'une robe « rouge » (animaux $E^{+}//E^{+}$), ce que l'éleveur peut réaliser par un croisement *ad hoc*… On s'attend à observer une robe rouge diluée inédite dans la race BPN actuelle.

# Volet « culard » : nos résultats en bref

- Alain Divo a obtenu dans son élevage le **premier animal culard décrit dans la race Bretonne Pie Noir**. Le phénotype de cette vache, nommé Chopin, comprend notamment la musculature importante de l'arrière train et l'attache haute de la queue sur le dos.
- Le phénotype « culard », décrit dans de nombreuses races, est causé par des mutations dans le gène **MSTN**, qui code la **myostatine**. La myostatine agit comme un « myostat ». Lorsqu'elle fonctionne moins bien ou plus du tout, la croissance de la masse musculaire est dérégulée.
- Dans l'ensemble, 9 polymorphismes (substitutions non sens, faux sens, délétion) avaient déjà été décrits dans le gène *MSTN*. Nous voulions savoir si la mutation responsable chez Chopin était l'une de ces 9 mutations, ou une nouvelle jamais décrite et apparue spontanément.
- Nous avons sélectionné 3 couples d'amorces afin d'amplifier les parties codantes des 3 exons de ce gène.
- Les élèves de première S ont réalisé plusieurs extractions et amplifications indépendantes pour ces trois amplicons. Ils ont découvert (sur 2 amplifications indépendantes lues sur les 2 brins) une **substitution non sens dans le 3$^{e}$ exon : C 5068 → T, CAA (Gln 358) → TAA (Stop). Cette mutation, jamais décrite, serait apparue spontanément chez la BPN.**
- Le résultat de cette mutation non sens est une protéine raccourcie de 357 acides aminés contre 375 dans la protéine normale. Cette troncature des 18 derniers acides aminés seulement pourrait permettre de conserver une certaine activité, d'où le phénotype « modéré » de Chopin.

# Projet Bretonne Pie Noir :
# volet « robe », résultats 2018 détaillés

# Problématique : déterminisme génétique des robes pie glazig et pie rouge chez la Bretonne Pie Noir

Le type de la Bretonne Pie Noir (BPN)

Dans la race Bretonne Pie Noir, les robe étaient autrefois variées : brun rouge, gris ardoise ou gris étourneau (« glazik »), chamoisé... Ces robes non standard sont devenues rares, quelques éleveurs les recherchent. Nous traquons les polymorphismes responsables, afin de mieux comprendre le déterminisme de la couleur, et d'offrir aux éleveurs le moyen de connaitre le potentiel de leur cheptel dans ce domaine.

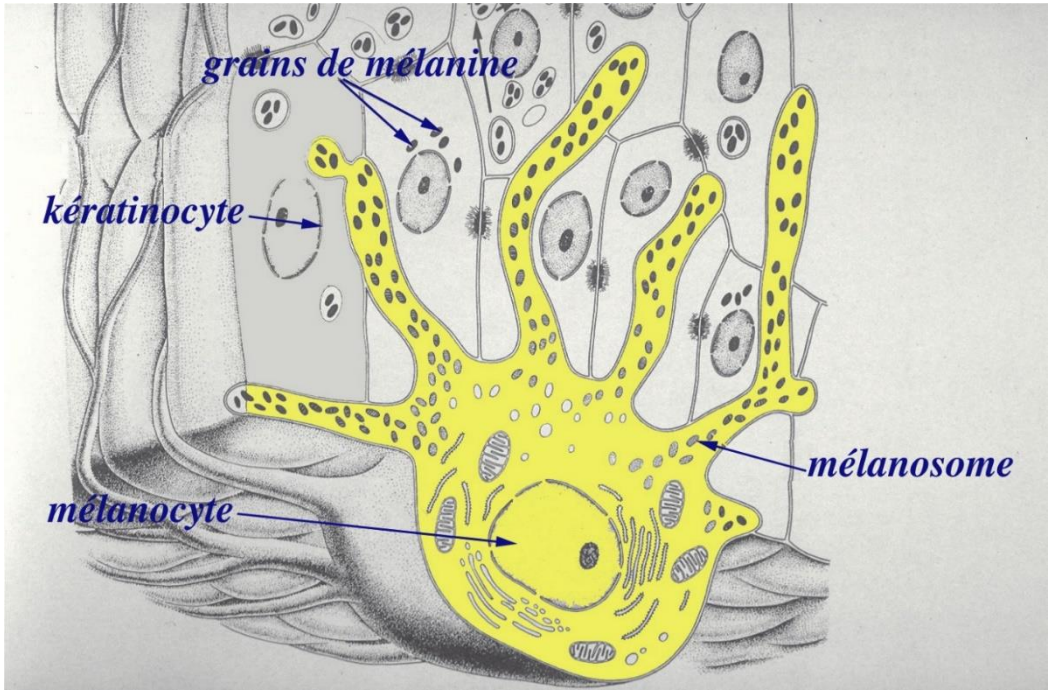
*Glaz* = bleu-vert en Breton

Animal pie glazig, peint par J-R. Brascassat vers 1850.

Bretonne pie-rouge (Finistère, peinte vers 1917)

# La pigmentation : un déterminisme complexe

Les mélanocytes sont les cellules responsables de la pigmentation de la peau et des poils. Elles synthétisent le pigment et le distribuent aux kératinocytes environnants.



La robe dépend de l'absence de pigment (blanc) ou, lorsqu'il est présent, de sa nature : **eumélanine, noire ou brun chocolat, et phéomélanine, plus rouge.** Ces mélanines peuvent être mélangées entre elles ou exprimées « pures » (robes noires / robes rouges), elles peuvent être également « diluées ».

Les gènes étudiés ici sont impliqués dans des aspects différents de la pigmentation : la synthèse et la nature du pigment, la maintenance des mélanosomes où le pigment est empaqueté, et la distribution des mélanosomes dans les dendrites des mélanocytes.

**Chez les bovins, le gène principal dans le contrôle de la robe est *MC1R***, qui code le **récepteur membranaire de l'hormone mélanocortine**. Son activité détermine la **proportion des deux formes de mélanine.**

# Les gènes étudiés

## Déterminant principal de la couleur de robe : Locus Extension / gène *MC1R*

| Gène | Chr | Code | Fonction | Allèles | Occurence |
|---|---|---|---|---|---|
| *MC1R* | 18 locus Extens | Récepteur de l'hormone mélanocortine | Transduction du signal, détermine la balance eumélanine/phéomélanine | $E^d$ : dominant, couleur noire<br>$E^+$ : sauvage, couleur brune<br>*e* : récessif, couleur rouge | BPN, Prim'Holstein par ex.<br>Normande par ex.<br>Limousine par ex. |

## Gènes candidats pour la dilution de la robe : *KITLG, PMEL, TYRP1, MLPH*

| Gène | Chr | Code : | Fonction | Allèles | Occurrence |
|---|---|---|---|---|---|
| *KITLG (MGF)* | 5 locus Roan | Facteur de croissance, ligand de KIT | Cytokine qui stimule la croissance des mélanocytes en se liant à un récepteur membranaire | Exon 6, allèle R : les hétérozygotes $R/r^+$ sont bleus sur fond génétique $E^d$ | Phénotype « blue roan » chez la Shorthorn ; Blanc bleu belge |
| *PMEL (SILV)* | 5 locus dilute | Premelanosome protein | Glycoprotéine transmembr., participe à l'organisation des mélanosomes via des fibres | Exon 2, délétion $D_H$ : codominant, $D_C$ : allèle trouvé chez la Charolaise | phénotype Dun (chamoisé) chez Highland, Galloway hétérozygotes pour $D_H$ |
| *TYRP1* | 8 | Protéine 1 associée à la tyrosinase | Voie de biosynthèse des mélanines / de l'eumélanine<br>Maintenance des mélanosomes | Exon 7, Substitution C → T à l'origine de Histidine (CAT) → Tyrosine (TAT) ; récessif | Race Dexter : responsable de la robe « dun » à l'état homozygote |
| *MLPH* | 3 | Mélanophiline | Mouvements des mélanosomes le long des microtubules, vers les dendrites des mélanocytes | Délétion de 10 pb dans le premier exon codant<br>Trois SNP non synonymes dans le 3e exon codant | Phénotype « dark cool grey » chez la Blanc bleu belge<br>Phénotype « Larson blue » chez Holstein ? |

# Le gène *MC1R* : locus « *Extension* »

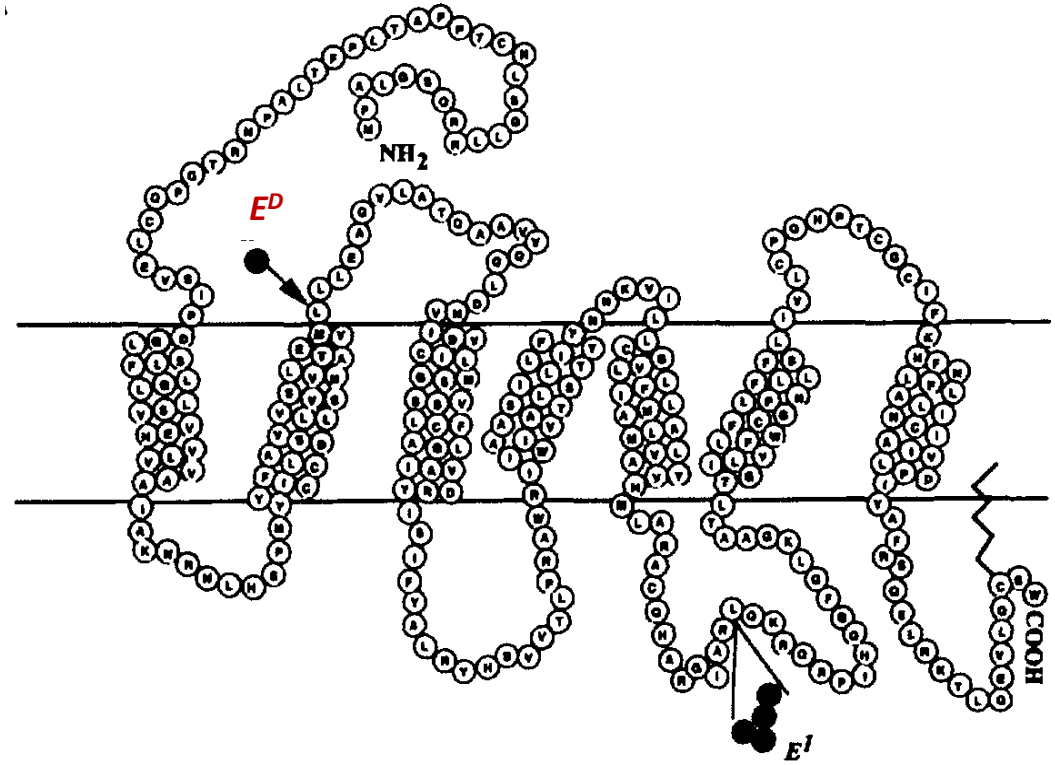
Séquence codante de 954 pb sans introns, code une protéine de 317 aa. C'est le récepteur membranaire de l'hormone mélanocortine ; activé par son ligand, il stimule la production d'eumélanine, pigment noir.

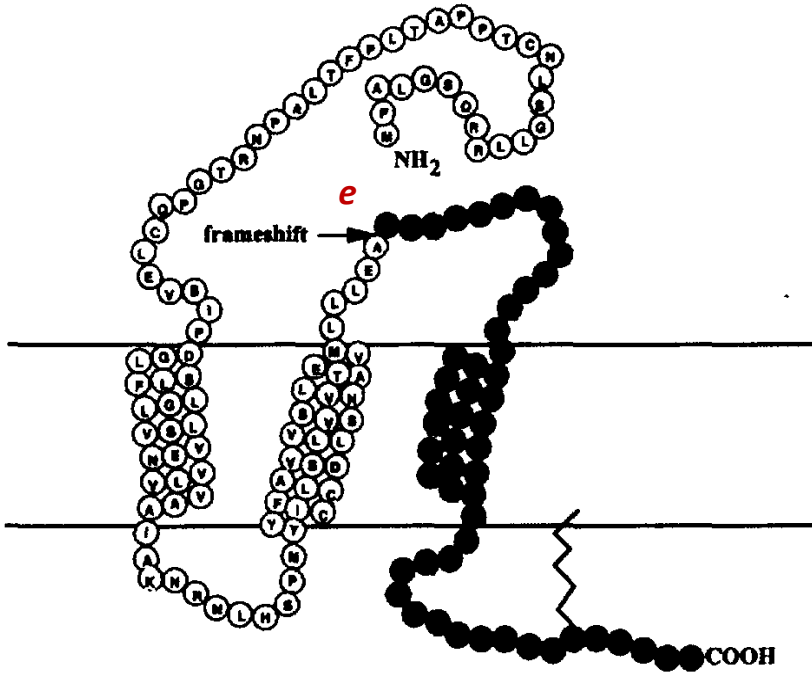
- **L'allèle sauvage est noté $E^+$**
- **L'allèle $E^D$ est une substitution T → C en 296** (à partir du début de la séquence codante)
- **L'allèle *e* est une délétion du G en 310** (à partir du début de la séquence codante)
- Trois paires d'amorces (fonds colorés) choisies de manière « embrassée » ont été utilisées pour amplifier **toute la séquence codante** (en gras) et une partie des 5' et 3' UTR.

**$E^D$ : T → C 296** **e : G 310 délété**

TACCGCGGCCCGGTAAGGCAGGAGGTCCCCACAGGACAGGAGGAGGCAAGCGGCCCAGAAATGTCTGCCTGTGGGCAACCGCACATCCAGGGA
AGAGGTGGGGAGGCGGACTGAGAACAGAAGAGCGAAGCCGCGCCCAGAGGGCTGGCCCCATAAGCTTGGGGCCATGCCTGGGCCGACATTTGT
CCAGCCAGGGAGGGGAGGTGTGAGGCCCCTCCCAGGGGAGCCATGAGTTGAGCAGGACCCTGAGAGCAAGCACCCCTTCCTGCTCCCTGCGGG
ACG**ATGCCTGCACTTGGCTCCCAGAGGCGGCTGCTGGGTTCCCTTAACTGCACGCCCCCAGCCACCCTCCCCTTCACCCTGGCCCCCAACCGG**
**ACGGGGCCCCAGTGCCTGGAGGTGTCCATCCCTGACGGGCTCTTTCTCAGCCTGGGGCTGGTGAGTCTCGTGGAGAACGTGCTGGTAGTGGCT**
**GCCATTGCCAAGAACCGCAACCTGCACTCCCCCATGTACTACTTTATCTGCTGCCTGGCTGTGTCTGACTTGCTGGTGAGCGTCAGCAACGTG**
**CTGGAGACGGCAGTCATGCTGCTGCTGGAGGCCGGTGTCCTGGCCACCCAGGCGGCCGTGGTGCAGCAGCTGGACAATGTCATCGACGTGCTC**
**ATCTGCGGATCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCCTGGGTGCCATTGCTGTGGACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCCCTGCGGTACCACAGT**
**GTTGTGACACTGCCCCGAGCGTGGAGGATCATTGCGGCCATCTGGGTGGCCAGCATCCTCACCAGCCTGCTCTTCATCACCTACTACAACCAC**
**AAGGTCATCCTGCTGTGCCTCGTTGGCCTCTTCATAGCTATGCTGGCCCTGATGGCCGTCCTCTACGTCCACATGCTGGCCCGGGCCTGCCAG**
**CATGCCCGGGGCATTGCCCGGCTCCAGAAGAGGCAGCGCCCCATTCATCAGGGCTTTGGCCTCAAGGGCGCTGCCACCCTCACCATCCTGCTG**
**GGCGTCTTCTTCCTCTGCTGGGGCCCCTTCTTCCTGCACCTCTCGCTCATCGTCCTCTGCCCCCAGCACCCCACCTGTGGCTGCATCTTCAAG**
**AACTTCAACCTCTTCCTGGCCCTCATCATTTGCAACGCCATTGTGGACCCCCTCATCTATGCCTTCCGCAGCCAGGAGCTCCGGAAGACGCTC**
**CAAGAGGTGCTGCAGTGCTCCTGGTGA**GGGTGGCAGTGCCGTCGTGTGCCCCAGGCCTGTGAGGCCAGGGCAGTCCCTTGACAAAGAGGATCG
GCTAGACCATCCCTGAAGGTGAGGGTGCACAGGCCTTTGGGGCCTGAGAGGGGAATCTCAGGACTCTCCAGGAGGCTGTGCAGAATGAGGAGG
CTGGGGAGATGGTGGGGCATGGCCTCCCACACCTAGAAAGGAGGGCCCCCACCCCTCCATCTGGGGCCCCACTCTGGGGCCGGTGCCCACACC
CCACCCCACCCAAAGCTGTGGGAAGTCCCGCTCCAAGGACTTCATGACCAGCACAGGAGGAGGTGGGGCCCACAGTGGGGGGCTTTTCTCTTC
TAACGCTCTGTGGTGACTGGGAGCCGGGCTCAGCCCGTCTGCCAGCAGCACATGCATTCGGCAGACACCCCAGCCAGGCCTGCTCTGGGGAAC
CAGCAGCCAATATGCAGGCTCCAGGGCCAGGAAGCAGTGCAGCAGTATTAATAAACGTGATGCTTGGTGCAACCT

# Le récepteur de la mélanocortine, codé par *MC1R*



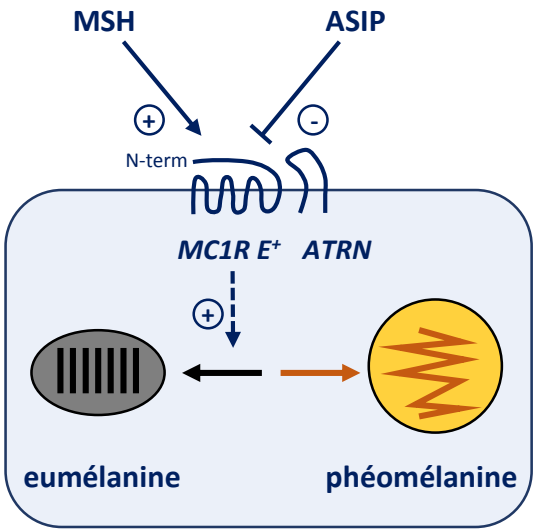

F. Rouzaud & al. (2000) *Genet. Sel. Evol*. 32:511-520

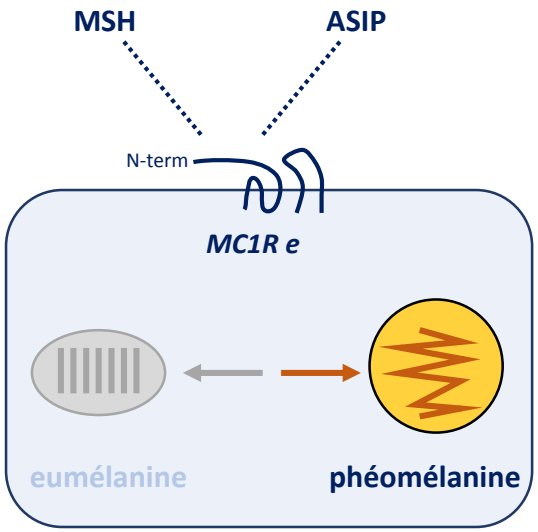
La protéine MC1R, récepteur de l'hormone mélanocortine (α-MSH), est un **récepteur à 7 domaines transmembranaires (récepteur couplé à une protéine G, RCPG)** ; les ligands (MSH et ASIP) se lient à la partie N-terminale extracellulaire, la liaison provoque changement de conformation et **transduction** du signal.

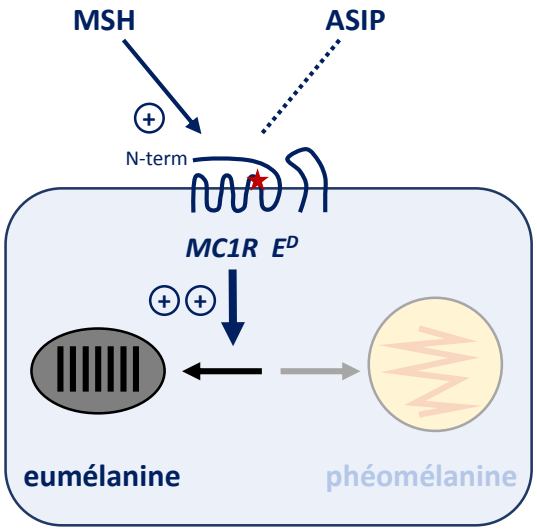
- L'allèle par défaut est $E^+$
- L'allèle $E^D$ est une substitution (C**T**G → C**C**G) qui change une leucine en proline dans la séquence de la protéine : protéine active de façon **constitutive** (permanente)
- L'allèle ***e*** est une délétion qui cause un décalage du cadre de lecture = frameshift (et l'apparition d'un codon stop plus loin) : protéine tronquée, inactive

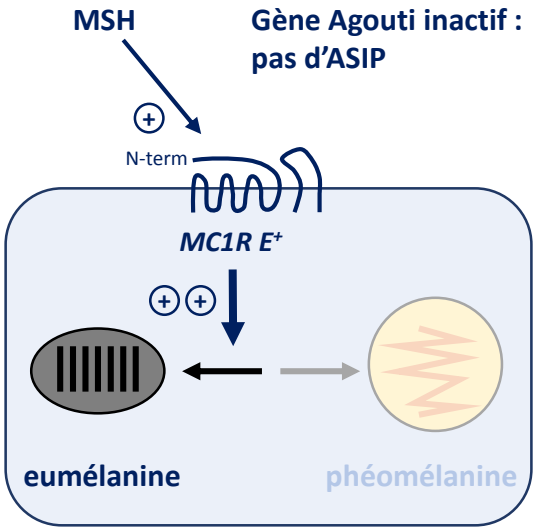
# Activité de MC1R et expression des mélanines

- **L'allèle « par défaut » *E*⁺ donne une robe marron foncé** : production balancée d'eumélanine noire et de phéomélanine brune, quand le peptide antagoniste codé par le gène Agouti (ASIP) s'y lie.
- **L'allèle *e*, à l'état homozygote, donne une robe rouge**. L'allèle *e* est de type « perte de fonction » (protéine tronquée, inactive : plus de synthèse d'eumélanine, reste la phéomélanine brune).
- **L'allèle dominant $E^D$, à l'état homozygote ou hétérozygote, donne une robe noire** : production exclusive d'eumélanine (MC1R ne lie plus ASIP ?)
- Une mutation dans le gène Agouti, qui code ASIP, peut aussi conduire au phénotype « robe noire », mais cet allèle est récessif.



# Résultat 2017 : présence de l'allèle $E^+$, responsable de la robe « rouge »

Le phénotype « rouge » chez la BPN est-il dû à l'allèle *e* retrouvé chez la Limousine, la Salers ? Ou s'agit-il de l'allèle sauvage $E^+$ associé à une grande variété de robes, du brun foncé au rougeâtre ?

Prim'Holstein : $E^D//E^D$

Normande : $E^+//E^+$

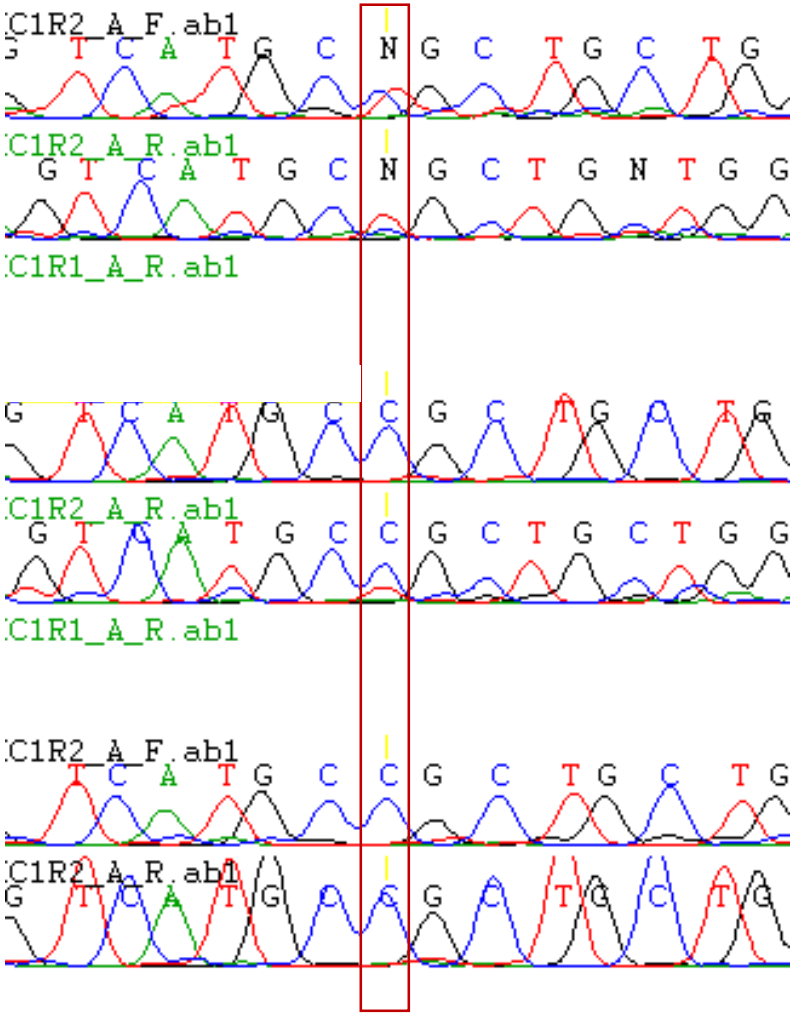
Limousine : $e//e$

**Nous n'avons pas retrouvé *e*, mais bien $E^+$ à l'état hétérozygote, et génotypé $E^+//E^+$ un animal « rouge ».**

A gauche : Lisette, une vache BPN pie « rouge » de l'élevage de A. et H. Ralison-Yon (Saint Michel et Chanveaux, Maine-et-Loire) , que nous avons génotypée $E^+//E^+$ en 2017.

A droite : Isidore, le principal géniteur de l'élevage d'Alain Divo, génotypé $E^D//E^+$ dès 2016.

# Gène *MC1R* : résultats 2018




Pour chaque animal, la séquence a pu être lue avec l'amorce forward (F) et reverse (R).

Iroise et son fils sont homozygotes $E^D//E^D$, le père, Isidore, est hétérozygote $E^D//E^+$ (tout comme la mère d'Iroise, Viorne).

L'allèle $E^D$ est dominant ; dans cette famille, la couleur de fond est donc noire.

Or les trois animaux ont une robe « diluée » : gris bleu pour Isidore et son fils, « chamoisée » pour Iroise.

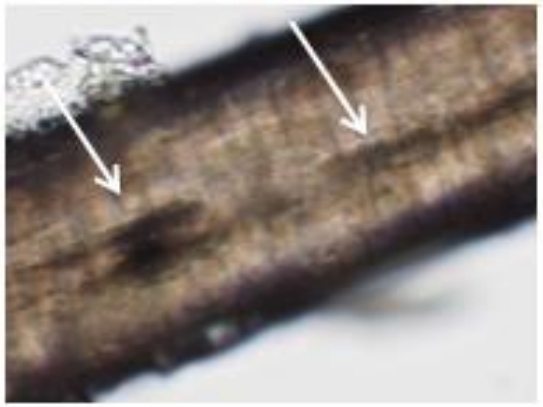
| | | | |
|---|---|---|---|
| Isidore (pie glazik) | T//C | $E^D//E^+$ | N (F) / N (R) |
| Iroise (pie glazik) | C//C | $E^D//E^D$ | C (F) / C (R) |
| Fils d'Isidore et d'Iroise (pie glazik) | C//C | $E^D//E^D$ | C (F) / C (R) |

# Résultats 2018 : le génotype au locus *Extension* n'a pas de lien avec le caractère dilué

- Nous nous sommes donnés les moyens **d'explorer toute la séquence du gène *MC1R***, et non la seule région du polymorphisme $E^D$, en utilisant 3 paires d'amorces, à la recherche de nouveaux polymorphismes.
- Chez les 3 animaux dont la séquence *MC1R* était lisible cette année, nous avons exploré la séquence codante et les parties 5'UTR et 3'UTR amplifiées. **Nous n'avons pas trouvé d'autres polymorphismes que $E^+$ et $E^D$**.
- Les animaux hétérozygotes $E^D//E^+$ sont en principe de robe noire ; or les animaux glazik (gris pour certains, chamoisés ou légèrement fauves pour d'autres) avaient tous été génotypés $E^D//E^+$ en 2017. Nous pensions donc que ce génotype hétérozygote pouvait se traduire par la présence accrue de phéomélanine, résultat d'une dominance incomplète de $E^D$ sur $E^+$. Sinon, il pouvait aussi s'agir d'une coïncidence (petit effectif), ou encore d'un déséquilibre de liaison avec la mutation responsable hors du gène *MC1R*.
- Cette année, deux animaux glazik ont été génotypés $E^D//E^D$. **Le phénotype glazik n'a donc rien à voir avec le gène *MC1R* et le locus *Extension*. Il s'agit bien d'une dilution du pigment dans le poil**, et non d'une production de phéomélanine déterminée par *MC1R*. Il fallait chercher ailleurs.
- Etonnamment, malgré la présence de l'allèle $E^+$ dans son cheptel, Alain Divo n'a pas encore obtenu d'animal de robe brun-rouge, $E^+//E^+$ (un croisement Isidore x Viorne, par exemple, donnerait cette issue dans un quart des naissances).

# Le phénotype « dilué »

- **Aurélien Capitan (INRA)** a vérifié que la couleur « glazik » (bleue grise) des animaux étudiés n'est **pas due à la juxtaposition de poils noirs et clairs** (robes « roan »), mais bien à la **« dilution » du pigment noir eumélanine dans le poil** (photo ci-dessous). Le terme « dilution », descriptif à l'échelle macroscopique, n'est pas très adapté à l'échelle microscopique où, au contraire, le pigment apparaît mal réparti.
- On connait un tel phénotype chez l'homme : syndrome de Griscelli de type 3, caractérisé par les reflets argentés des cheveux et la peau claire. Les pigments forment des agrégats dans la gaine des cheveux, les mélanosomes s'accumulent dans les mélanocytes.



Poil d'une vache BPN diluée (glazik) (flèches : eumélanine)

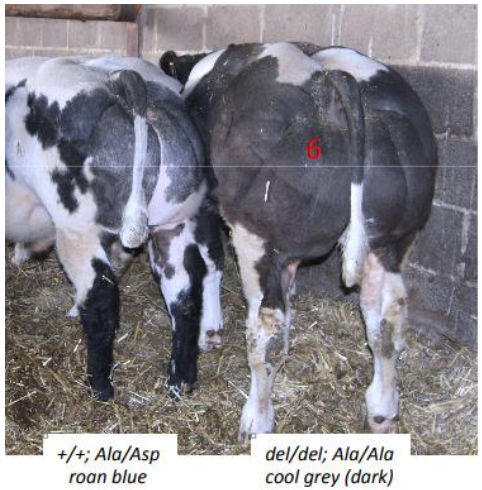
Poil humain tiré d'un individu atteint du syndrome de Griscelli

Phénotype associé au syndrome de Griscelli de type 3

# Des gènes candidats pour la « dilution » du pigment : *KITLG*, *PMEL*, *TYRP1* et *MLPH*

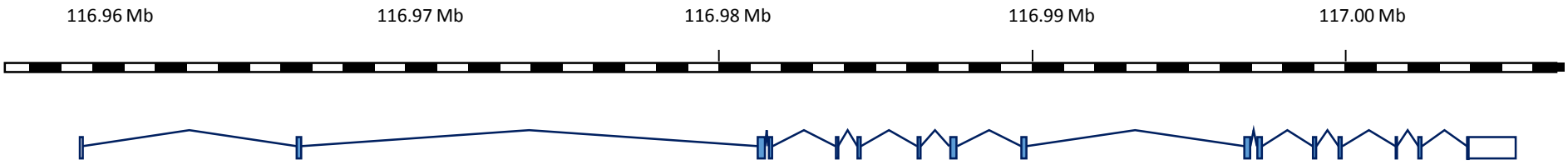
- En 2017, **nous avions testé 2 gènes candidats : *KITLG* et *PMEL*. Nous n'avions pas retrouvé les mutations déjà décrites dans ces gènes et associées à des robes « diluées ».** Ceci n'exclut pas bien sûr qu'ils soient impliqués, par le biais de mutations non décrites situées ailleurs (nous n'explorons que quelques centaines de pb, sur des lectures Sanger).
- Cette année, **nous avons testé 2 autres gènes candidats : *TYRP1* et *MLPH*.** Nous avons cherché les mutations déjà décrites : dans l'exon 7 de *TYRP1* ; dans les exons 2 et 4 de *MLPH*.
- Nous n'avons **trouvé aucun polymorphisme dans la séquence *TYRP1*** des 4 animaux testés (3 glazik et 1 noir).
- En revanche, nous avons **retrouvé la mutation décrite dans l'exon 2 de *MLPH***, associée à un phénotype dilué chez 3 animaux.

*Une Blanc bleu belge « cool grey dark » mutée dans l'exon 2 de MLPH.*



*Un veau Dexter « dun » muté dans l'exon 7 de TYRP1*

# Le gène bovin *MLPH* : gène candidat pour la « dilution » du pigment




- Gène *MLPH* sur le chromosome 3
- 16 exons, dont le premier non codant
- ARNpm de 45,89 kb
- ARNm de 3406 pb
- Protéine de 584 aa
- 4344 allèles !

Le gène *MLPH* code la **mélanophiline**, une protéine impliquée dans les mouvements intracellulaires des mélanosomes le long des microtubules, vers les dendrites des mélanocytes. C'est la protéine fautive dans le syndrome de Griscelli de type 3 chez l'homme.

On a associé, dans les exons 2 et 4, des polymorphismes à la dilution de la robe, chez la Blanc Bleu Belge (BBB) et la Holstein, respectivement. Nous avons retrouvé ces polymorphismes chez la Bretonne pie noir « diluée » (glazik).

# Amplicon : exon 2 (premier exon codant) du gène *MLPH*

Amorce F → C

**TCCAGCTCCTGGGAAATTGG**TGTTTTCTG**T**GTTGTCTCTTCCTTTGTGACTCGCCCGGCA

→ GAC G

CCCGCACAGGCTTCCTGGGCT**TTT**T**T**CTGGGCCCTGTGTTACTCCAGGTGTGACCTTGAC

→ C G

GAGCAG**T**A**T**AG**ATG**GGGAAGACACTGGATCTTTCCAAGCTCACGGATGAAGAGGCCAAGC

del

ATGTCTGGGAGGTGGTTCAACGGGACTTCAACCTTCG**GAGGAAAGAA**GAGGAAAGACTAG

AGTGAGTGTGTGGCGGGGCCCTCGCAGCTGGGACCCGTGCAGCTGGGACCTGTGCAGCTG

→ T

GGGCCCTTGCAGCTGGGACCCTCACACCTGGGACCCATGCAGCTGGGGCCC**G**TGCAGCTG

G**CCCTAGCATCTCTGGAGGGG**

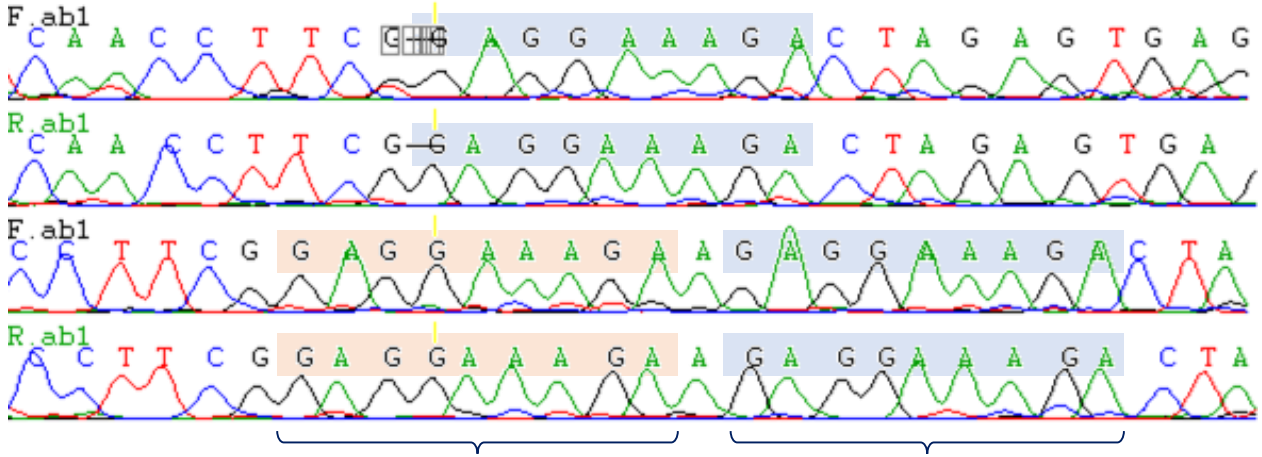
Amorce R

**Exon :** 5′ UTR | Seq cod

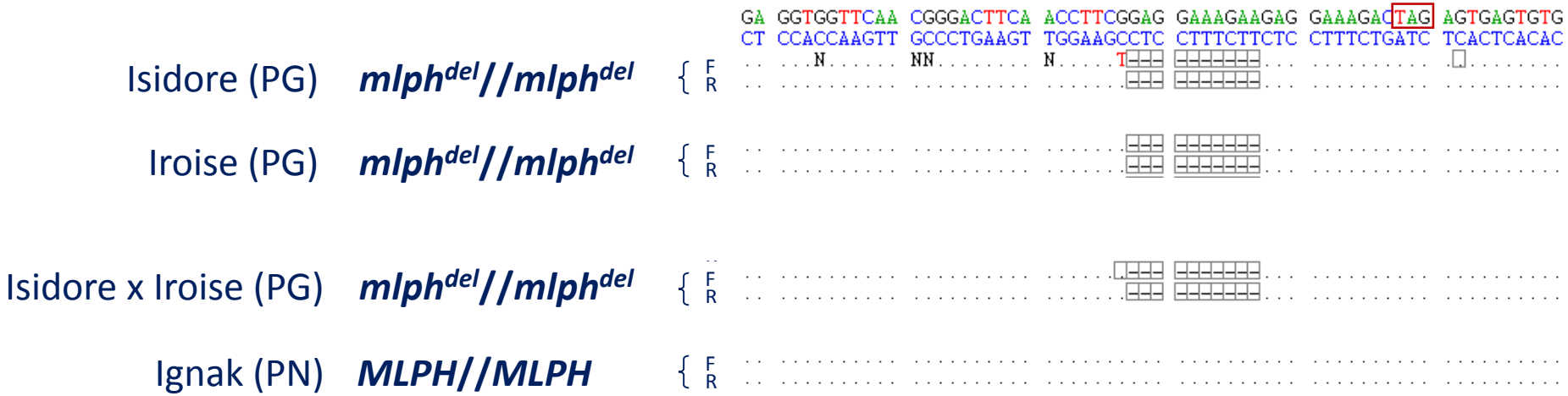
# Délétion dans l'exon 2 (premier exon codant) de *MLPH*

Isidore x Iroise (PG)
***mlph^del^//mlph^del***

Ignak (PN)
***MLPH//MLPH***




La **délétion de 10 pb** concerne une **répétition de 9 bp**, quasi en tandem. Cette délétion crée un **décalage du cadre de lecture**. La traduction se termine prématurément avec un codon stop TAG 10 bases plus loin. **L'expression du gène délété donne un peptide certainement inactif de 32 aa seulement**.



# Une mutation dans *MLPH* déjà décrite chez la race Blanc Bleu Belge

Chez la race Blanc Bleu Belge (BBB), les robes « *cool grey* » et « *roan blue* » dépendent des loci *MLPH* et *KITLG* : moins bleue que roan, la robe « cool grey » est causée par une délétion à l'état homozygote dans le premier exon codant de *MLPH* ; la robe est un peu plus claire si l'animal possède un allèle muté de *KITLG*.

Nous avons retrouvé **dans le gène *MLPH*, chez 3 Bretonnes pie noir « glazik », la même délétion que chez les BBB « cool grey » sombre**. Ces animaux sont en outre sauvages au locus *KITLG*. On est donc bien dans la configuration du « **cool gray » sombre**.

*Des animaux Blanc Bleu Belge de robe roan (au centre), « cool grey » clair (à gauche) et* ***« cool grey » sombre*** *(à droite).*

W. Li & *al.* (2016) *Animal Genetics* 47, 110-113

# Délétion dans *MLPH*, cause de la robe glazik ?

En résumé, nous proposons donc que **la robe « glazik » (= diluée), chez les Bretonnes Pie Noir de l'élevage d'Alain Divo, soit due à l'absence de protéine mélanophiline fonctionnelle** (animaux homozygotes pour la délétion dans le premier exon codant du gène *MLPH*). Ceci se traduirait par un défaut de distribution des mélanosomes contenant la mélanine le long des dendrites des mélanocytes. Il ne semble pas y avoir d'autres effets délétères.

Des questions demeurent :

- **La délétion a-t-elle un effet à l'état hétérozygote (est-elle dominante) ?** Le veau issu de l'union d'Isidore, dilué (del//del) et d'Ignak, non diluée (+//+), est dilué/chamoisé ; **la délétion, à l'état hétérozygote chez ce veau, semble donc dominante (la concentration de protéine fonctionnelle serait critique ; elle serait insuffisante chez l'hétérozygote)**. Une autre possibilité serait qu'Ignak ait transmis une copie inactive du gène, touchée par une délétion dans un autre exon (voir plus loin).
- **Comment expliquer les nuances de robe ?** Isidore et son fils obtenu avec Iroise sont gris bleu (très clair pour le veau) ; Iroise est « chamoisée » (reflets bruns). Pourtant les 3 sont homozygotes pour la délétion. Un ou plusieurs autres gènes doivent intervenir.
- Il serait intéressant d'observer l'effet de ce défaut de mélanophiline dans le contexte d'une robe « rouge » (animaux $E^+//E^+$), ce que l'éleveur pourra réaliser par des croisements *ad hoc*… On attend une robe « rouge diluée ».

# Un autre amplicon dans le gène *MLPH* : exons 3 et 4

Amorce F

→ C

**ACCTGACTTTGGGGTCGCTA**TTGTCTGAATCTCTGAATTTGATAGCTCTCT**G**TGTGTGTACACA

TTTAAAGCTTGTTGCAAAAACAAGGGGTCCAATATTTTCTTGTTTCCAATAAAGGGGGTTGAAG

GGCAAGATTAAGAAGGAAAACTCCAAGAGGGAGCTGCTTTCAGACACGGCCCACCTGAACAACA

CCCACTGCGCCCGCTGCCTGCAGCCCTACCGGCTCCTTGAGACCCCCAAGAGGCAATGCCTGGA

→ G

CTGCCACCTCTTCACCTGCAGAGGCTGCGGCCACCCCCACCC**A**GAGGAGCAAGGCTGGCTCTGT

CCA (Pro)
→ CCG (Pro)

→ C

GACCCCTGCCACCTGGCCAGGTGAGTGGGACCTC**G**AGGTC**G**GAGGGTCCTGCAGATGAGGGGCT

del microsat.

TGGCCTGTCCCTTCCAGGGACTCGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**TG**CACCCCCCAGGGCAAGGCGTGG

→ A

GCCTGAGCTCCGTGTCCCCGCCTGCAGGGTC**G**TGAAGATGGGCTCACTGGAGTGGTACTACAGC

GTG (Val)
→ ATG (Met)

→ CA → A

CACGTGAGAGCCCGCTTCAAG**AG**CTTCGGGAGC**G**CCCAGGTGGTCCGGTCCCTCTGCGGGCGGC

AGC (Ser)
→ CAC (His)

TGCAGGGAGCA**GGTAAGGAGTGGGCCTCCTC**

Amorce R

GCC (Ala)
→ ACC (Thr)

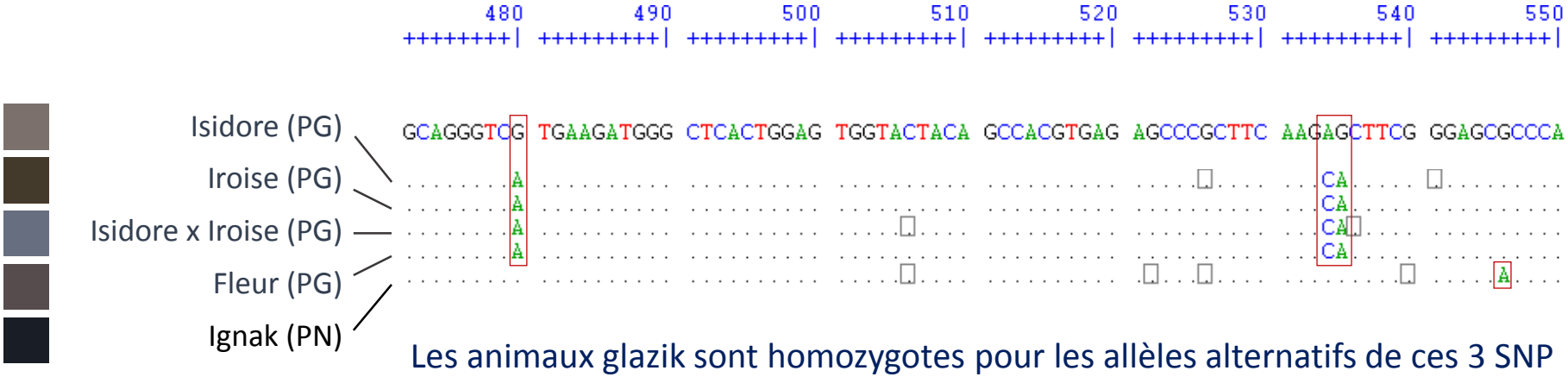
exon

# Des SNP faux-sens dans l'exon 4 de *MLPH*

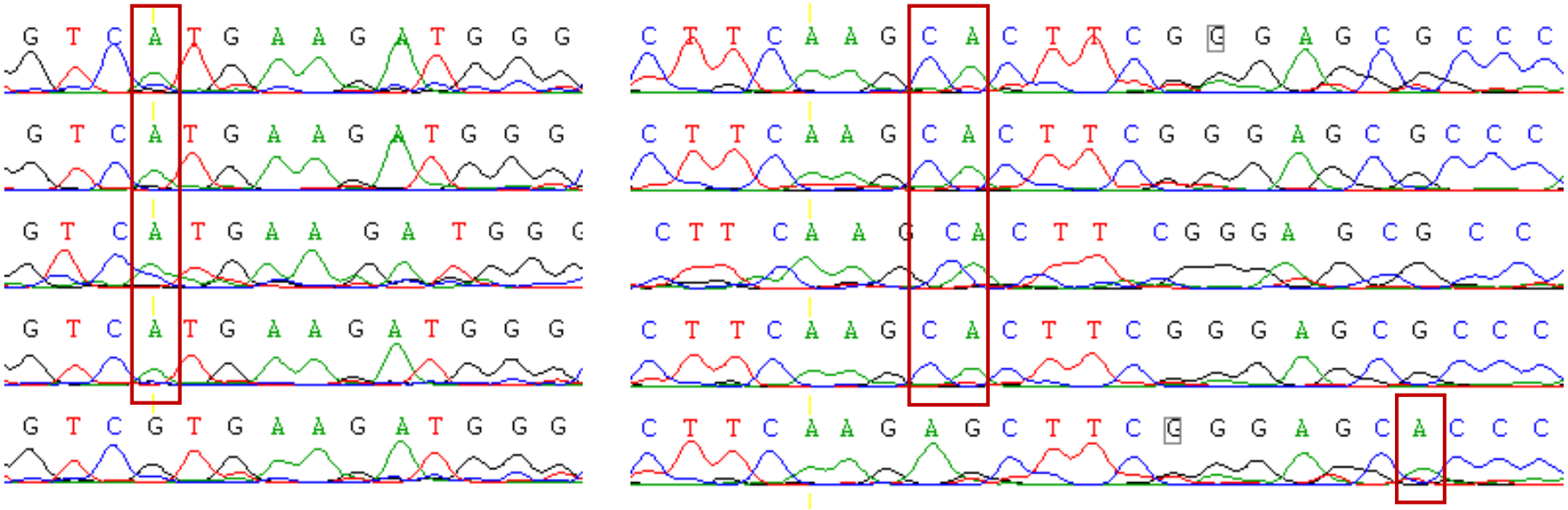
- Nous avons également testé 3 positions polymorphes (SNP) connues dans l'exon 4 du gène *MLPH*. Ces substitutions faux sens pourraient avoir un effet sur la protéine.
- Selon S. Dikmen & al., la robe « Larson blue » chez la Holstein serait causée par ces 3 SNP faux-sens à l'état hétérozygote. Toutefois, ce résultat est mal étayé, la nature disruptive des allèles n'est pas évidente (la substitution la plus sévère serait Ser→His) et ils ont été retrouvés depuis dans de nombreuses races qui ne présentent pas de robe « diluée ».
- Ces 3 positions sont également polymorphes dans le cheptel BPN d'Alain Divo. Un animal de robe noire (Ignak) est homozygote pour les allèles de référence (ceux de la race Hereford), tandis que des animaux de robe glazik sont homozygotes pour les allèles alternatifs. Il est probable que ces SNP dans l'exon 4 sont en déséquilibre de liaison avec la délétion dans l'exon 2.
- Le défaut de mélanophiline responsable de la robe glazik ne peut être attribué à ces SNP dans l'exon 4 puisque chez les animaux glazik, la traduction s'interrompt dans l'exon 2 (effet de la délétion)…

*Veau Holstein de robe « Larson blue ». Les animaux Larson blue possèdent 3 SNP faux-sens dans l'exon 4 de MLPH à l'état hétérozygote. S. Dikmen et al. (2017) J. Anim. Sci. 95:1164–1169*

# Des SNP faux-sens dans l'exon 4 de *MLPH*



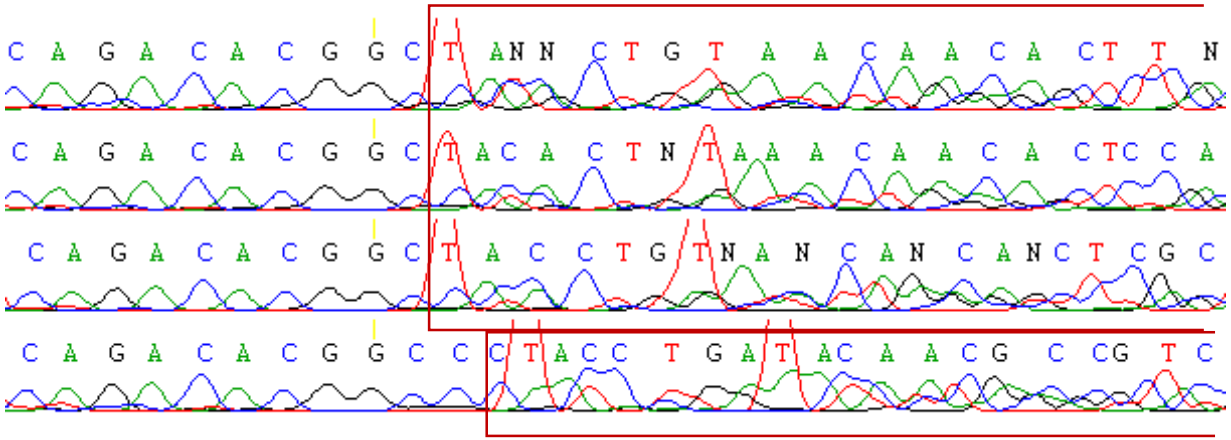

Les animaux glazik sont homozygotes pour les allèles alternatifs de ces 3 SNP faux sens. Ignak, animal noir, est homozygote pour les allèles majoritaires (mais présente un autre SNP faux sens plus loin).



# Un autre allèle délété de *MLPH* est-il présent ?

Amplicon : exons 3 et 4 de *MLPH*

Deux bandes pour cet amplicon : 606 pb (taille attendue) et une autre 200 pb plus bas



Il est possible qu'une autre mutation (délétion) du gène *MLPH* soit présente dans le cheptel. En effet :

- Chez tous les animaux testés, la PCR qui amplifie les exons 3 et 4 livre deux bandes : l'une à la taille attendue, une autre plus courte de 200 pb environ. Il pourrait s'agir d'un allèle délété de *MLPH* présent à l'état hétérozygote, ou d'une amplification non spécifique.
- En outre, les séquences Reverse de cet amplicon *MLPH* montrent une dégradation de la qualité de la séquence au milieu de l'exon 3 : il pourrait s'agir de la superposition de séquences normale et tronquée. C'est la limite du séquençage Sanger : il faudrait faire un southern blot pour être fixé.
- Le veau glazik issu d'Isidore et d'Ignak pourrait alors reçu une copie délétée dans l'exon 2 de son père Isidore, et une copie délétée dans l'exon 3 de sa mère Ignak.
- On ne pourrait alors statuer sur le caractère récessif ou dominant de l'absence d'une copie fonctionnelle de *MLPH* (sans doute récessif).

# Autres résultats : des polymorphismes silencieux trouvés dans les deux amplicons *MLPH*

| Situation | Intron 1 | | 5' UTR | Intron 2 | Intron 2 | Exon 3 | Intron 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Position** | +6869 | +6921 | +6976 | +7191 | +21620 | +21848 | +21974 |
| **Séq. réf.** | T | TTTTT | TAT | G | G | A | TG |
| **Animal** | | | | | | | |
| Isidore | C//C | GACTG//GACTG | CAG//CAG | T//T | C//C | G//G | --//TG |
| Iroise | C//C | GACTG//GACTG | CAG//CAG | T//T | C//C | G//G | --//TG |
| Isidore x Iroise | C//C | GACTG//GACTG | CAG//CAG | T//T | C//C | G//G | TG//TG |
| Fleur | C//C | GACTG//GACTG | CAG//CAG | G//T | C//C | G//G | --//TG |
| Ignak | C//C | GACTG//GACTG | CAG//CAG | G//G | G//G | C//C | --//TG |

# Projet Bretonne Pie Noir :
# volet « culard », résultats 2018 détaillés

# « Culard », un caractère monogénique associé au gène *MSTN*

- Alain Divo a obtenu dans son élevage le **premier animal culard décrit dans la race Bretonne Pie Noir**. Il s'agit d'une vache nommée Chopin. Le phénotype « culard » comprend notamment la musculature importante de l'arrière train et l'attache haute de la queue sur le dos.
- Décrit dans de nombreuses races bovines (ainsi que chez d'autres mammifères), le phénotype « culard » est causé par des mutations dans le gène ***MSTN***, qui code la protéine **myostatine**. Les animaux ne sont pleinement culards que lorsque ces mutations sont à l'état homozygote : il s'agit donc d'allèles récessifs de type « perte de fonction ». La myostatine agit comme un « myostat ». Lorsqu'elle fonctionne moins bien ou plus du tout, la croissance de la masse musculaire est dérégulée.
- Dans l'ensemble, 9 polymorphismes causant culard (substitutions non sens, faux sens, délétions) ont déjà été décrits dans le gène bovin *MSTN*. Nous voulions savoir si la mutation responsable chez Chopin était l'une de ces 9 mutations, ou une nouvelle jamais décrite et apparue spontanément.
- Nous avons utilisé 3 couples d'amorces afin d'amplifier les parties codantes des 3 exons de ce gène (les 9 mutations culard décrites sont toutes dans la séquence codante).

# « Culard », un caractère monogénique associé au gène *MSTN*

A gauche, Chopin, dans l'élevage d'Alain Divo, première vache culard décrite dans la race BPN.

Le taureau Noé, dans l'élevage d'Eric Tocqueville. Notez l'attache haute de la queue. En comptant Noé et Chopin ci-dessus, 3 animaux culards sont désormais décrits dans la race BPN.

# Structure du gène *MSTN* codant la myostatine

Séquence transcrite : les 3 exons sont stabilotés (parties codantes en bleu, parties 5’ et 3’ non codantes en gris), les amorces utilisées pour les amplifier sont en gras souligné, les mutations « culardes » connues sont en jaune.

AGATTCACTGGTGTGGCAAGTTGTCTCTCAGACTGGGCAGGCATT**AACGTTTGGCTTGGCGTTAC**TCAAAAGCAAAAGAAAAGTAAAAGGAAGAAGTAAGAACAAGGGAAAAGATTGTATTGATTTTAAAACC**ATG**CAAAAACTGCAAATCTCTG
TTTATATTTACCTATTTATGCTGATTGTTGCTGGCCCAGTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGTGTAATGCATGTTTGTGGAGGGAAAACACTACATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATCCAA
ATCCTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATCAGACAACTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCTGGAACTGATTGATCAGTTCGATGTCCAGAGAGATGCCAGCAGTGACGGCTCCTTGGAAGACGATGACTA
CCACGCCAGGACGGAAACGGTCATTACCATGCCCACGGAGTGTGAGTAGTCCTGCTGGTGC**AGAGCAACGACTCTGCTGAC**TGCTGTTCTAGTGTTCATGAGAAACCGATCTATTTTCAGGCTCTTTTAACAAGCTGCTGGCTTGTATGTAAGGA
GGAGGGGAAAGAGCTTTTTTCAAGATTTCATGAGAAATAGACCAATGAGACTGAAAGCTGCTACTTTATTTGTTTCCTTAGAGAGCTAAAAAGCTAAAAATCAAAAATGAAATGCTTGCATAGCATTCATGTTATATAGTTTAGTATGACAACTA
TAACATGTTTATGTTTTCACAGCTTAATGCTACCAAGGTAAAGGATTGGGAGACAGTATCAGCAATGTGAAAAATTTACATCAAATTTCCTAATTGCATTTGGTTGCCTGAAATATGCATTTATAATAACAGGTTTTTTTTTTTTTCATTAATA
AAAGAGAAAGGAAGAAATCTGTAGAGGTTGAAGCCTATCTGGGCATTTGCTGAACACTTAGAATGACTTCTGTTATTCAAAACTATTTCTCATAGGGTTTTTATGGTCTTCACAGAGTATCTAATTTTGAAAGCTATTAGAGTGGAAAGGATAAA
AGAATATTCTTAATAAACTTAATGTATTAGTAAGAGCAATAAGGAAGTAAACACAGCATAGTGAAAAATCATGAGCTAATCAGCAGAAAATTCTAAGAAATAAACATTTTAATTACAAAGTTCCACTTATACCCTGACCATGGTACTATTGTTGA
GAGTACCTGGTCTGCACATATCTAGGAGGCACATGCTTAATAACCTTCTAAAATATTATTTTATTCCTCATAGGAGGGAGAACTATTACCTATATGTAGTACCTATGTTGTTTCTGAAAGATAATATGTTTCATATATTTCTGTTGCAGTCACTT
CAAACCTATACTCAAGGAAAGGGAGACAGGCACCTCAACAGAGAAGGCATGACCAGAAAGAGTTTTGTGCCATGTGTCTGCGATCTTGCTTTATACAGGGCTCTACCCACTTTAAACTGGACTCAAAACAGTTTCAAAATACTGCTTTTTCTTAT
TAAGTAACTAGTTTATAAGGCAACAAATAAATTTCCTTTAAGACTGTGCTATCAGATAATCCTGGAATAGATTTGCCTTACTTATAAACAATCTTGAGAAAACAAAAAGGCAAGAAATTGCTAAGTGCTTCTGCTTACAATGACAGCCTGGCCCT
AAAGACAATGTTTTCTAAGTTTTGAAACAGCTTGAATACAACATCTAAGTTTTGGTGCTAATTACCTGCTAGTTTTTTTATTTTTTTCCTTTAAAAGGCTGTCCCAGCGTCCTAACATAACAGATGCACTATATTTTCTGCTAATTCCCGAGGCT
CAGTTAGTTGCTCACTGTGTCTTGTCCCCAGGTAATTCAGGCCTGGGGGAAGGGTTCCTTCCTCCAGACTGATTGGTACAGCTGCTCAGTAAGTGTAACTACTCAGATTCCCAAAGAATTCTAAGTGGATGTTCTTCCACAGTGTCTCTTGTTCT
CTCTAATCATCATCATTTTAAAATTTCATCCACTTTTCATTCCTTAATAGAATTTTCCTTAGTCCACAGTTCTCTGGAAAGGAAGTAGGCTGCTCATAACAGCTGAAAAAACATATACCTAAAAGATTCTGAAAAGCTGTAATAACTGTTATACT
TGATATTTTGCTGTTATGAATGAAATGCTACATATTTTTCCATTTTAAAAGACTAAATATGCACACATTATTCCAATTAAAAAAATGTTCATAGATTGATA**TGGAGGTGTTCGTTCGTTTTT**CATAAAAATGATCTTAGTAACTTTTTTTTCTTA
TTCATTTATAGCTGATCTTCTAACGCAAGTGGAAGGAAAACCCAAATGTTGCTTCTTTTAAATTTAGCTCTAAGATACAATACAATAAACTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATATATCTGAGGCCTGTCAAGACTCCTGCGACAGTGTTTGTGCAAA
TCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACTGGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAGAACTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACTTAGGC
ATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGCCATGATCTTGCTGTAACCTTCCCAGAACCAGGAGAAGATGGACTGGTAAGTGATTACTGAAAATAACATGCTAAAAACCTTGTTATGTGTTTATTCATAATGTGAATGAATAGTAGTGAAAAATA
ACTACCAGTTTCCTGTGCTTATAA**GCCAGACAAAGGTGCCTTA**CCCCAGTGGTAGCCCTGTACCCAATAAAAGTAGGTGTCCCATTTCACATCCTATGAAACACTCTCTTGATACTTTGACTTTGCATGAGGATTTAAAAGAAAAAAAGTTATAC
TATGGTCCTTAAGTTTTTAGGGAATTCTTTGGAATTGAGAATGAAATATAAAATGCTTTCCATTGATGTGCTACATGATTATATACATAAAAACATGAAGTCTTCACAGTGGATTCTAGTACACACCCAACAACACATTTTTTCCCCCAGAAGAG
TGACCAATTTGTTAAAATTCTTTTGCTTAATAAAGCAGAAAAATGAACTCTACAAGTTATAATTAAAATAAAATGCTTTTACTTATAGAAATTAACTAGATATATGTTCAGGTTTATATACTATTAAATATACTATATTTAAGATCTCTCATGAT
AAATATGTTCCTTGTTTTATAGACTATTGATGCACTGATGTATATGTGGATTACTTTGTGAATTACCCCTGGTAAAATTAAAAATTTCAGGCTAGTTAACTTGTACTACTTAGCTATTTTCTGAACTGTCTTACTGTTCTTTAACAGGAGTTAAC
TTAGGTAATGTCAACTAATTTAATATAAAGTCAAACAGAAAATAATGCCTTATATATTATAAAAATTAATAAAAAACCATTTTAAAATCTAGTATAAGTTTAGAGCTACTCACTCTTCTGGCTTATCTATGCTTGTATTTACTTCTGTTTTCAAA
AAATTTTTTAATGTGACCATACCTTTTATTTCCATTTATTGATATAATTTACAACAAAAGATTATACTTGCAAGCTTTATGGTTTTTAAATGGTCTTTTTTGTAGTGAATATCATATCTAAATGATATCTAAATGTAAAGTAAATCATACCTAAA
TGAAAACATATTCTTTAAGACATTATAAAATTTTCCAGGTGATCAATTTTTCTTTAAATATACTACATAAAATGTTATTGACTCCCAAAATGATGTTATTTTGTATAATCTTAAATACCAATAATTACCAGGTCTATTTTGGTTTTAGTGTAGGA
TAAAAAAGAATGTGTTCTTTTTTCTAGGTAGCATTTTAATGATCAAAGTTGGTGACGTGACAGAGGTCTTAAGTATTATTAAACAGATGATTAATAAGATGTATTCCTCAGACTTTTCCATATAAAAGGAAAAATGTCTCAAATTCATGAAAAGA
TTGGTACAGGAGGAGGATTAGCAAATTGTAGTTTAAATATCTGAATGGAAACATTTTTTAGTGAAAGAATAAAGGGAATATCATTGTATCTTCTTCTGAGTCTGTGCCTCTCTCTCTTGGAGTTAGTCTTTCCAACCCTATATACTTACCACTAT
CTTCATCCCTCTACCTTCCTTTTCCCATTACATCTGTGCAGTACTGGGTGGCAACTATTGTGTTTCGGTGTTAACATCCAAGTTTCCCTGAATAAGACCAAGTGAATGGAGGATGAATGAGTATACCTATCCCTCCAGGAGTCATCAGACATAT
TTAGCCACCATATTTAATCAATAAGCAGGAAGACATAAGCTAGCCTTGTCCCTCTTCTTTCCTCCCTGCTCCTTTCTCTTCTCTTCCCCCTCTCCCTTTACTGTCATCCATCAGTATTTTCACAGCATCTATTATGTGTCAGGCATTCAGATACT
CAAACGGAGGAAAACAAGAATAAACAAGACAAAGATCTGACCACAGGGGAATCCCTATGGCTACTGTAGACTTTTGAGCCATAAAGGAAGAATCAAGCCTAGTGTAAATGAAAATTCCTTAATGCTGTGCCTTTTAAAAAGAAATGTGACATAAG
CAAAATGATTAGTTTTCTTTCTTTAATAATGAGTCCTTGA**GGTAGGAGAGTGTTTTGGGATCT**ATTATTAACTCTTCTTTCCTTTCCATACAGACTCCTTTTTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCTAGGAGAGATTTTGGGCT
TGATTGTG**ATGAACACTCC**ACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGCTTTTGGATGGGATTGGATTATTGCACCTAAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAATTTGTATTTTTGCAAAAGTATC
CTCATACCCATCTTGTGCACCAAGCAAACCCCAGAGGTTCAGCCGGCCCCTGCTGTACTCCTACAAAGATGTCTCCAATTAATATGCTATATTTTAATGGCGAAGGACAAATAATATACGGGAAGATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGG
TGTTCA**TGA**GGTCTATATTTGGTTCATAGCTTCCTCA**AACATGGAAGGTCTTCCCCTC**AACAATTTTGAAACTGTGAAATTATGTACCACAGGCTATAAGCCTAGAGTATGCTACAGTCACTTAAGCACAAGCTACAGTATATGAGCTAAAAAGA
GAGAATATATGCTATGGTTGGCATTTAACCATCAAAACAAATCGTATAATAAAACGTTTTATGATTTCCAGAGTTTTTGAACTAGGAGATCAAATTCCATTTATGTTCAAATATATCACAACACATGCAGGTGAATGAAAGCAATTCTCCTTGTC
TTCTGGTGAATTAAAGGAGTATGCTTTAAAATCTATTTCTTTACAGTTTCACTTAATATTTACAGAAAAATCTATATGTAGTATTGGTAAAATGCAGTATTGTTATATACCATTATTTGAAACATCCTTAAACACTTGAATTTATATTGTATGAT
AGCATACTTGGTAAGATGAGATTCCACAAAATAGGGATGGCACACCGTACGCAAGTTACCATTCCTATACTGATTGATACAGTACATTAACAGTTTTTGCCAATGGTGCTAATACAATAGGCTGAATGGCTGATGTTATCAGGTTTATCAAGCAA
AAAACGTTCAGGAAAGTAATAAGTTTCTCCTTTCTTCAGGTGCATTTTCACACTCCTCCCTATGGGCAATGGATGTTCTATAGAGAAAGAAAACTCATTCTCCTAGAGGTCTACATTCAATTCTGTAGCATACTTGGAGAAGCTGCATTGAAAAG
GCAGTCAAAAAGTATTCATTTTGGTCAAAATTTCAAAATTATAGCCTGCCTTTGCAATACTGCAGCTTTTAGGATGAAATAATGGAAATGACTGATTCTATCAATATTGTATAAAAAGATTTTGAAATAGTTGCATTTATATAATATGTATACAA
TATTGTTTTGTAAATAAATGTCTCCTTTTTTATTTACTTTGGTATATTTTTACAGTAAGGACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAAAGACATGTCATGTAGGACATAAAAGCAAAAGCCTATATTTTGGAGCAAATTAGTTGATTAAATAGTG
GTCTTAAAACTCCATATGCTAATGGTTAGATGGTTATATTACAATCATTTTATATTTTTTTACATTATTAGCATTCACTTATGGATTCATGATGGCTGTATAATGTGAATGTGAAATTTCAATGGTTTACTGTCATTGTATTCAAATCTCAACGT
TCCATTATTTTAATACTTATAAATATTAAGCATACCAAAATGATTTAACTCTATTATCTGAAATCAGAATAATAAACTGATGATATCTTACAAATTGTTAATTTTATTTTATAATTTGATAATGAATATATTTCTGCATATATTTACTACTATTT
TGTAAATCAGGATTTTGTTAATCAAATAAATTGTACTTATGATTAAGTGAAATTATTTCTTACATCCAATGTGTAGAAACAATTTAAGTTATATTAAAGTGTTTTCACCTTTTTTGAAAGA

# Séquence codante de *MSTN* et mutations « culardes » connues

- **C 415 → A,** TT**C** (Phe 94) → TT**A** (Leu)
- **C 447 → G,** T**C**C (Ser 105) → T**G**C (Cys)
- **Nt 2382** (del 7 ins10)
- **G 2507 → A,** **G**AC (Asp 182) → **A**AC (Asn)
- **C 2573 → T,** **C**AG (Gln 204) → **T**AG (Stop)
- **G 2639 → T,** **G**AA (Glu 226) → **T**AA (Stop)
- **Nt 4814** (del 11)
- **G 4867 → T,** **G**AA (Glu 291) → **T**AA (Stop)
- **G 4934 → A,** T**G**T (Cys 313) → T**A**T (Tyr)

Parties codantes des 3 exons

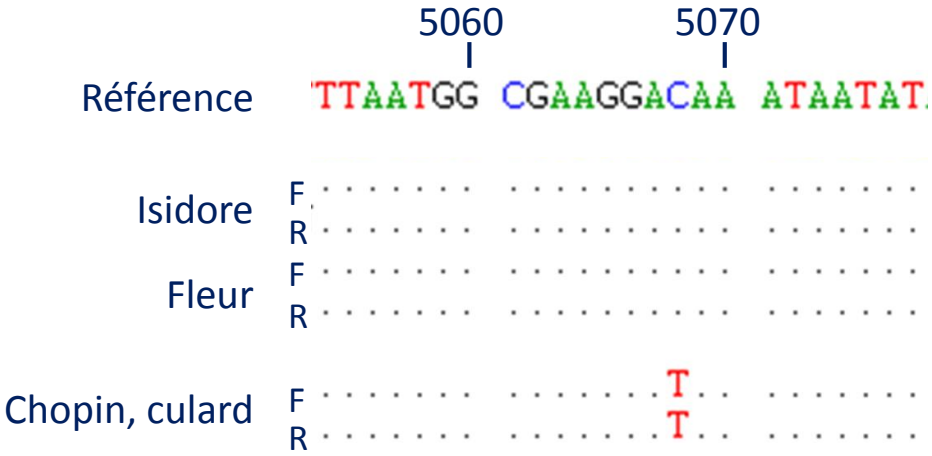
Codon touché

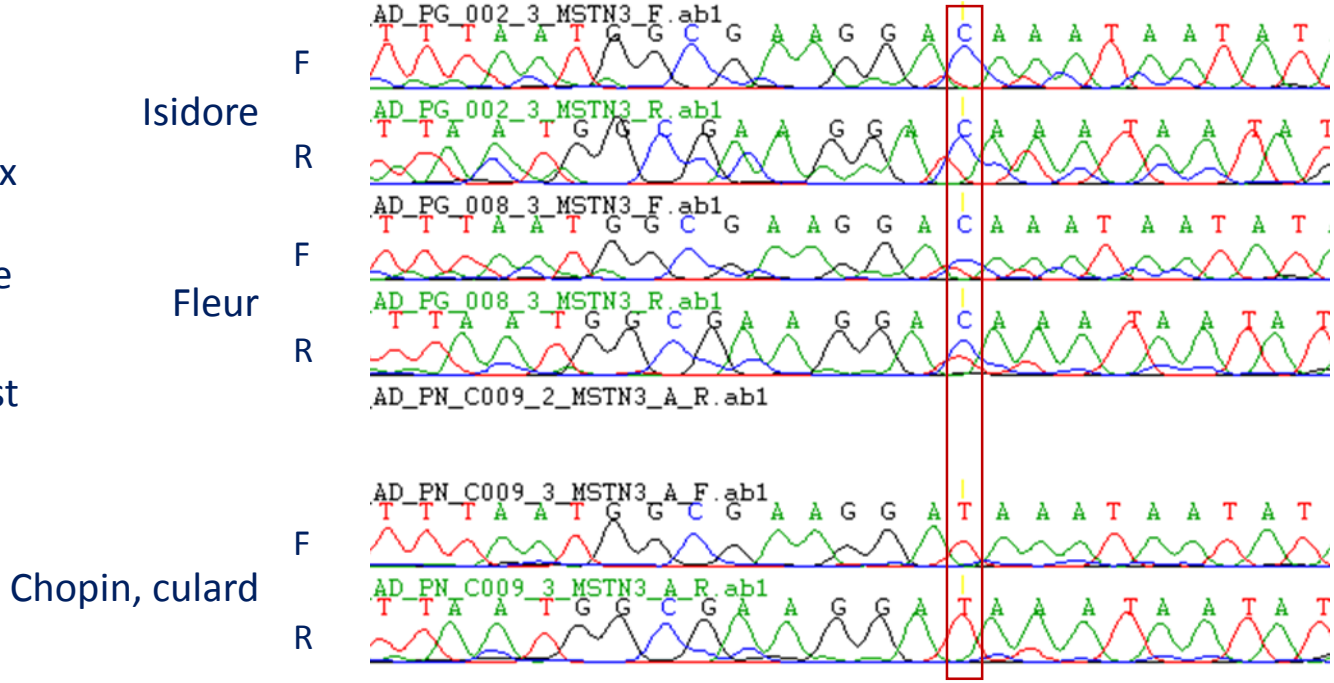
```
ATGCAAAAACTGCAAATCTCTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGATTGTTGCTGGCCCAGTGGATCTGAATGAGAACAGC   81
GAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGTGTAATGCATGTTTGTGGAGGGAAAACACTACATCCTCAAGACTAGAA  162
GCCATAAAAATCCAAATCCTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATCAGACAACTTTTG  243
CCCAAGGCTCCTCCACTCCTGGAACTGATTGATCAGTTCGATGTCCAGAGAGATGCCAGCAGTGACGGCTCCTTGGAAGAC  324
GATGACTACCACGCCAGGACGGAAACGGTCATTACCATGCCCACGGAGTCTGATCTTCTAACGCAAGTGGAAGGAAAACCC  405
AAATGTTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAGATACAATACAATAAACTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATATATCTGAGGCCT  486
GTCAAGACTCCTGCGACAGTGTTTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATC  567
CGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACTGGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAGAACTGGCTC  648
AAACAACCTGAATCCAACTTAGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGCCATGATCTTGCTGTAACCTTCCCAGAA  729
CCAGGAGAAGATGGACTGACTCCTTTTTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCTAGGAGAGATTTTGGGCTT  810
GATTGTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGCTTTTGGATGGGATTGG  891
ATTATTGCACCTAAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAATTTGTATTTTTGCAAAAGTATCCTCATACC  972
CATCTTGTGCACCAAGCAAACCCCAGAGGTTCAGCCGGCCCCTGCTGTACTCCTACAAAGATGTCTCCAATTAATATGCTA 1053
TATTTTAATGGCGAAGGACAAATAATATACGGGAAGATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGTTCATGA
```

# Découverte d'une mutation non sens jamais décrite dans le 3e exon du gène *MSTN*

- Encadrés par M. Terracol et Mme Nedellec, les élèves de première S du lycée Berthelot ont réalisé plusieurs extractions de l'ADN de l'animal culard Chopin, et plusieurs amplifications indépendantes pour les trois amplicons.
- Ils ont découvert (sur 2 amplifications indépendantes, lues chacune sur les 2 brins) une **substitution non sens dans le 3e exon** : **C 5068 → T**, faisant passer **du codon CAA (Gln 358) au codon TAA (Stop).**
- **Cette mutation, jamais décrite, serait apparue spontanément chez la BPN. La pratique de la consanguinité l'a fait apparaître à l'état homozygote, permettant l'expression du caractère culard.**
- Le résultat de cette mutation non sens est **une protéine raccourcie**, longue de 357 acides aminés contre 375 dans la protéine normale. Cette **troncature des 18 derniers acides aminés** pourrait permettre de conserver une certaine activité, d'où le phénotype « modéré » de Chopin.

# Découverte d'une mutation non sens jamais décrite dans le 3e exon du gène *MSTN*




- Isidore et Fleur, tous deux non culards, semblent homozygotes pour l'allèle sauvage (C) ;
- L'animal culard Chopin est homozygote pour l'allèle muté (T).

# Séquence codante de *MSTN* et nouvelle mutation culard « Berthelot »

Exons

Codon touché

**Nouvelle mutation découverte au LMB :**

**C 5068 → T,** CAA (Gln 358) → **T**AA (Stop)

```
ATGCAAAAACTGCAAATCTCTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGATTGTTGCTGGCCCAGTGGATCTGAATGAGAACAGC   81
GAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGTGTAATGCATGTTTGTGGAGGGAAAACACTACATCCTCAAGACTAGAA  162
GCCATAAAAATCCAAATCCTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATCAGACAACTTTTG  243
CCCAAGGCTCCTCCACTCCTGGAACTGATTGATCAGTTCGATGTCCAGAGAGATGCCAGCAGTGACGGCTCCTTGGAAGAC  324
GATGACTACCACGCCAGGACGGAAACGGTCATTACCATGCCCACGGAGTCTGATCTTCTAACGCAAGTGGAAGGAAAACCC  405
AAATGTTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAGATACAATACAATAAACTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATATATCTGAGGCCT  486
GTCAAGACTCCTGCGACAGTGTTTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATC  567
CGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACTGGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAGAACTGGCTC  648
AAACAACCTGAATCCAACTTAGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGCCATGATCTTGCTGTAACCTTCCCAGAA  729
CCAGGAGAAGATGGACTGACTCCTTTTTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCTAGGAGAGATTTTGGGCTT  810
GATTGTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGCTTTTGGATGGGATTGG  891
ATTATTGCACCTAAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAATTTGTATTTTTGCAAAAGTATCCTCATACC  972
CATCTTGTGCACCAAGCAAACCCCAGAGGTTCAGCCGGCCCCTGCTGTACTCCTACAAAGATGTCTCCAATTAATATGCTA 1053
TATTTTAATGGCGAAGGACAAATAATATACGGGAAGATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGTTCATGA
```

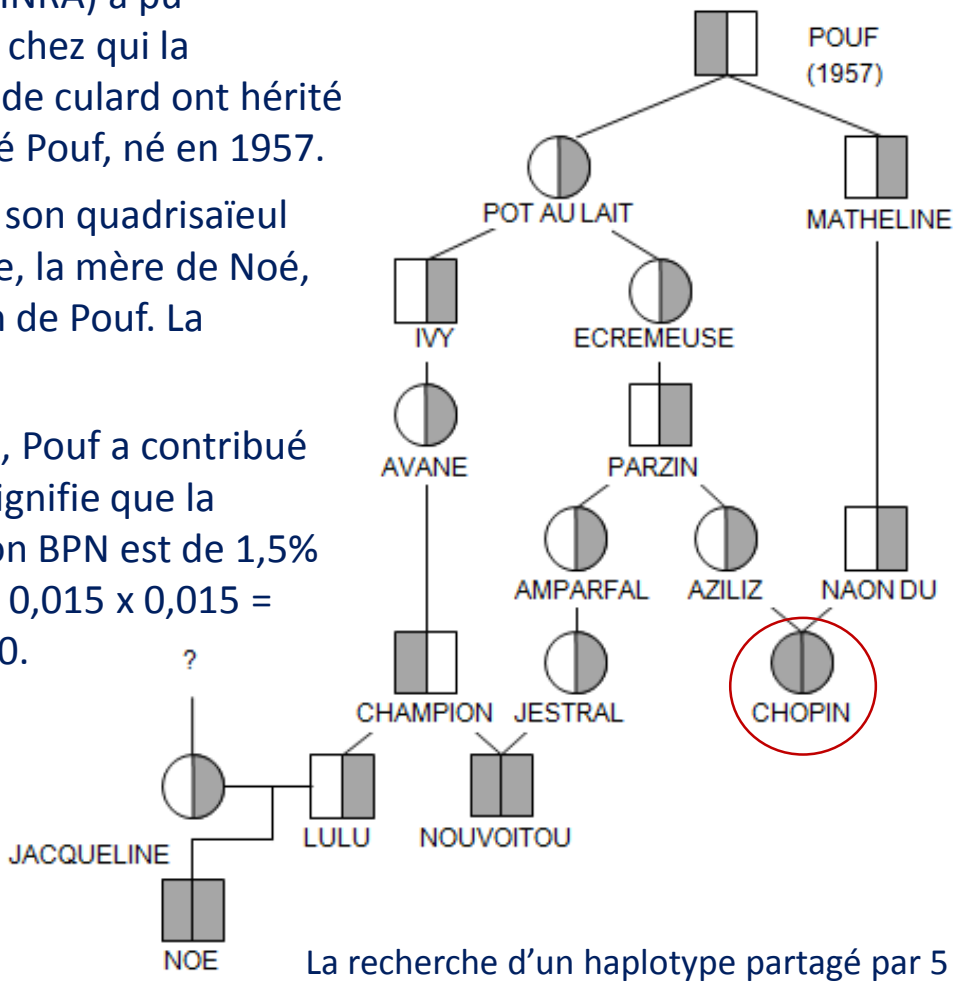
# Origine de la mutation culard « Berthelot »

En analysant le pédigrée des 3 animaux BPN culards (donc homozygotes pour la mutation), **Aurélien Capitan** (INRA) a pu remonter à l'ancêtre commun ; c'est-à-dire l'animal chez qui la mutation est apparue ; et dont chacun des parents de culard ont hérité (unions consanguines). Il s'agit d'un taureau nommé Pouf, né en 1957.

Pouf est l'arrière grand père paternel de Chopin, et son quadrisaïeul maternel. Une incertitude demeure pour Jacqueline, la mère de Noé, mais elle a sans doute, elle aussi, hérité la mutation de Pouf. La recherche généalogique le précisera.

Du fait du goulot d'étranglement qu'a connu la race, Pouf a contribué pour 3% du patrimoine génétique de la race. Cela signifie que la fréquence actuelle de la mutation dans la population BPN est de 1,5% et que la probabilité d'apparition d'un culard est de 0,015 x 0,015 = 2,25 $10^{-4}$ soit un peu plus de 2 naissances sur 10 000.

Comme la population totale de BPN n'est que de 3000 têtes, les naissances de culard – une attendue tous les deux ans - ne sont pas un problème (d'autant qu'aucun taureau d'insémination artificielle n'est culard, par définition : standard de race). En revanche, la mutation a un effet même à l'état hétérozygote : effet significatif et positif sur les carcasses et la conformation, négatif sur la note d'engraissement.




La recherche d'un haplotype partagé par 5 taureaux de cet arbre, et non possédé par les animaux non issus de Pouf, révèle un intervalle de 15 Mb au début du chromosome 2… qui inclut le gène *MSTN* ! C.Q.F.D

# Une découverte utile aux éleveurs

UNION BRETONNE PIE NOIR

RACES DE BRETAGNE

La connaissance de cette nouvelle mutation intéresse les éleveurs de BPN ! Notre recherche a donc un débouché pratique. Nos élèves ont pu s'initier au monde de la recherche, mais aussi découvrir les problématiques de l'élevage.