



**HAL**  
open science

## Connaissances actuelles sur les gènes de coloration chez le poulet

David Gourichon, Bertrand Bed'Hom, Agathe Vieaud, Jean-Luc Coville,  
Michèle Tixier-Boichard

► **To cite this version:**

David Gourichon, Bertrand Bed'Hom, Agathe Vieaud, Jean-Luc Coville, Michèle Tixier-Boichard. Connaissances actuelles sur les gènes de coloration chez le poulet. 8. Journées de la Recherche Avicole, Mar 2009, Saint-Malo, France. hal-01193512

**HAL Id: hal-01193512**

**<https://hal.science/hal-01193512>**

Submitted on 3 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES GENES DE COLORATION CHEZ LE POULET

**D. Gourichon<sup>a</sup> B. Bed'hom<sup>b</sup> A. Vieaud<sup>b</sup>, J-L. Coville<sup>b</sup>, M. Tixier-Boichard<sup>b</sup>**

*INRA<sup>a</sup> UE PEAT, 37380 Nouzilly, France*

*INRA<sup>b</sup> AgroParisTech, UMR1236 Génétique et Diversité Animales, Jouy en Josas, France*

### RÉSUMÉ

Le poulet montre une grande diversité de coloration du plumage. Schématiquement, on peut classer les gènes de coloration en trois catégories: - développement du mélanocyte - synthèse des mélanines - organisation subcellulaire du pigment dans le mélanocyte. La plume peut présenter différents dessins, qui résultent de l'interaction entre 2 gènes ou plus. Le séquençage du génome permet d'accélérer l'identification des mutations responsables de phénotypes particuliers. Nous avons utilisé différentes approches expérimentales pour identifier les mutations responsables de phénotypes connus : analyse de liaison à l'aide de marqueurs moléculaires dans une famille informative ; homologie poule/caille par production d'hybrides ; recherche de polymorphismes d'un gène candidat choisi par homologie avec la souris; recherche d'un allèle conservé entre races ayant en commun un même phénotype ; étude de l'expression du gène muté. Plusieurs mutations ont déjà été identifiées pour le gène *MC1R* (locus *E*) et pour le gène *TYR* (locus *C*). Plusieurs gènes de dilution ont été identifiés grâce à des collaborations avec des équipes européennes : *SLC45A2* (locus *S*- mutations 'argente' et 'albinos imparfait'), *MLPH* (locus *LAV*- mutation 'lavande'). L'identification de *SLC45A2* a été facilitée par la combinaison des approches 'analyse de liaison' et 'haplotype partagé' alors que la mutation 'lavande' a été identifiée grâce à une approche d'homologie avec la souris. La coloration jaune de la peau (locus *W*) est due à une mutation du gène *BCDO2* qui code pour une enzyme du métabolisme des caroténoïdes. L'identification de cette mutation a permis de mettre en évidence une origine hybride du poulet domestique, la mutation peau jaune provenant de *Gallus sonneratii* et non de *Gallus gallus*. Pour l'ensemble des gènes identifiés au niveau moléculaire, il est possible de mettre au point des tests de génotypage afin de détecter les porteurs de mutations récessives ou d'exclure la présence de la mutation.

### ABSTRACT

The domestic fowl exhibits a wide variation of feather colour. A general classification of colour genes may distinguish three categories : - melanocyte development - synthesis of melanins - subcellular organisation of pigment in the melanocyte (melanosome structure). The feather may show various colour patterns, which often result from the interaction of 2 or more genes. The chicken genome sequence can be used to accelerate the identification process of the mutations responsible for colour phenotypes. We have used several experimental approaches to identify some mutations : linkage analysis with molecular markers in an informative family, homology between chicken and quail , identification of a candidate gene by homology with the mouse, as a model species, search for a shared haplotype between breeds carrying the same colour mutation, gene expression studies. Several mutations had already been identified for *MC1R* gene (*E* locus) and *TYR* gene (*C* locus). This paper reports the identification of three additional mutations achieved in the framework of European collaborative projects. The *SLC45A2* gene has been found to carry the causal mutations for the silver allele and the imperfect albinos allele at the *S* locus, and a point mutation in the *MLPH* gene is responsible for the lavender mutation in chickens. The finding of *SLC45A2* was greatly facilitated by the combination of linkage analysis with a shared haplotype study, whereas the lavender mutation was identified through homology with the mouse. The yellow skin colour was due to a mutation in the *BCDO2* gene, which encodes an enzyme of the carotenoid metabolism. This mutation was found to originate from *Gallus sonneratii* and not from *Gallus gallus*, which shows for the first time that the domestic chicken has an hybrid origin. The current state of knowledge on chicken colour genes is finally summarized, and molecular diagnostic tests can be designed to help monitoring the genotype for recessive colour mutations.

## INTRODUCTION

La coloration de la peau et des phanères est une fonction complexe qui se prête bien à l'étude des relations entre génotype et phénotype. La souris est l'espèce modèle de référence mais le poulet présente aussi une grande diversité de phénotypes : de nombreuses mutations affectant la couleur de la plume ou de la peau ont été décrites (Smyth, 1990). Historiquement, les phénotypes de coloration ont été utilisés pour créer des races standardisées. Les gènes responsables ont donc été soumis à sélection dans les populations domestiques et peuvent aussi l'être dans les populations naturelles. Certains gènes de coloration ont déjà une application industrielle, c'est le cas de gènes liés au sexe (locus S pour le plumage argenté ou doré, locus B pour le plumage barré) qui permettent l'autosexage du poussin dans un croisement approprié. Un regain d'intérêt pour les gènes de coloration est observé avec le développement de la production de produits typiques, liés à une race régionale. Dans ce contexte, il est utile de connaître le déterminisme génétique de la coloration souhaitée, afin de maîtriser son homogénéité au cours de la sélection d'une lignée. La génétique mendélienne propose une interprétation génétique (Coquerelle, 2000) qui peut être validée par la mise en oeuvre d'outils moléculaires spécifiques des gènes en cause. Le séquençage du génome du poulet permet maintenant d'accélérer l'identification des mutations responsables de phénotypes particuliers. Il devient alors possible d'identifier les hétérozygotes porteurs d'une mutation récessive sans procéder à un testage de descendance.

L'identification moléculaire de gènes de coloration peut combiner plusieurs approches qui vont être présentées et illustrées avec des résultats récents.

### 1. Rappels sur les bases biologiques et le déterminisme génétique de la coloration

La coloration résulte de la production de pigments, l'eumélanine (noire) et la phaeomélanine (jaune). Ces pigments sont synthétisés dans les mélanocytes, cellules spécialisées qui se différencient à partir de la crête neurale chez l'embryon et migrent ensuite le long de l'axe dorsal. Les pigments sont empaquetés dans des granules intra-cellulaires, les mélanosomes, qui sont ensuite transférés aux kératinocytes du follicule plumeux. Plusieurs gènes peuvent intervenir à chacune de ces étapes. Certaines mutations n'affectent qu'un seul pigment et d'autres affectent les deux pigments. La synthèse des pigments est effectuée par un complexe d'enzymes, où la tyrosinase, codée par le gène *TYR*, joue le premier rôle. L'activité de la tyrosinase est régulée par l'hormone mélanostimulante dont le récepteur est codé par le gène *MC1R*. Ces deux gènes correspondent à des locus bien connus en génétique avicole : le gène *MC1R*

correspond au locus *E* (Takeuchi et al., 1996 ; Kerje et al., 2003) et le gène *TYR* au locus *C* (Tobita-Teramoto et al., 2000, Chang et al., 2006). L'association du phénotype 'blanc dominant' à une mutation du gène *PMEL17* (Kerje et al., 2004) permet de distinguer le blanc récessif du blanc dominant au niveau moléculaire.

## 2. METHODES

### 2.1 Production d'une famille informative.

Une famille est dite informative si elle permet d'établir la liaison entre un marqueur génétique et la transmission d'un phénotype coloré particulier. Généralement, le déterminisme génétique de ce phénotype est de type mendélien et on doit disposer d'animaux reproducteurs hétérozygotes pour la mutation responsable du phénotype. Par exemple, le phénotype 'IG' pour 'Inhibitor of Gold' se caractérise par une dilution du rouge en couleur crème très clair, allant jusqu'au blanc sale chez le coq. Le mode de transmission de ce phénotype est celui d'une mutation autosomale récessive. Nous avons produit une génération F2 selon le schéma suivant :

F0 : 2 coqs 5 poules  
 $IG^*N/IG^*N$  X  $IG^*IG/IG^*IG$   
 Phénotype normal      phénotype dilué 'IG'  
 □  
 F1 : 3 coqs 18 poules  $IG^*N/IG^*IG$   
 Phénotype normal  
 □  
 F2 : 3 génotypes possibles, 2 phénotypes  
 $\frac{1}{4}IG^*N/IG^*N$   $\frac{1}{2}IG^*N/IG^*IG$   $\frac{1}{4}IG^*IG/IG^*IG$   
 Phénotype normal      phénotype dilué

La génération F2 comportait 517 poussins des deux sexes, dont 327 ont été phénotypés à l'âge de 8 semaines. L'ADN génomique a été extrait à partir du sang, et des prélèvements de peau et de foie ont été réalisés en vue de l'extraction d'ARN sur 32 animaux. Cette famille était également informative pour la mutation *W* responsable de la peau jaune.

Des familles informatives de ce type comportant 40 à 300 animaux ont été produites dans l'élevage du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (UE PEAT, 37380 Nouzilly) pour étudier la ségrégation de plusieurs phénotypes de coloration : dilution 'lavande' (locus *LAV*), dilution 'blue' (locus *BL*), inhibition de la coloration avec 'argenté' et 'albinos' (locus *S*).

Le génotypage de marqueurs microsatellites est ensuite réalisé sur les parents F0, F1 et les descendants F2 pour rechercher une liaison génétique entre un marqueur et le phénotype. En l'absence de toute information préalable sur la localisation possible de la mutation, il est nécessaire d'utiliser un grand nombre de marqueurs couvrant tout le génome. Il est alors souhaitable de produire une génération F2

informative pour plusieurs mutations observables indépendamment. Dans certains cas, l'utilisation de données antérieures peut permettre de limiter le nombre de marqueurs à utiliser (mutation liée au sexe, mutation liée à une autre anomalie déjà localisée sur un chromosome). Le résultat de l'analyse de liaison permet d'identifier la position chromosomique, de façon souvent assez peu précise. Il faut encore préciser la position et rechercher dans cette région un gène dit 'candidat' dont la fonction pourrait potentiellement concerner la coloration.

## 2.2. Homologie entre espèces.

On fait ici l'hypothèse qu'un phénotype similaire (même couleur diluée par exemple) peut être dû à une mutation du même gène dans deux espèces différentes. Par exemple, Brumbaugh et al (1972) en étudiant la morphologie des mélanocytes de poulet de phénotype 'lavande' ont observé une anomalie très proche de celle observée sur les mélanocytes de souris de phénotype 'leaden'. Cette approche permet donc d'identifier un gène candidat.

Il est possible de tester cette hypothèse expérimentalement entre les espèces poule et caille par complémentarité fonctionnelle (Minvielle et al., 2002). La méthode consiste à produire des hybrides poule x caille par insémination de cailles femelles avec du sperme de coq même si le taux d'éclosion reste faible (de 1 à 8%). En utilisant des coqs homozygotes pour une mutation récessive et des cailles femelles homozygotes pour la mutation supposée homologue, il est possible de démontrer cette homologie : si les deux mutations sont identiques, les hybrides expriment le phénotype de l'homozygote muté. Cette observation permet de transposer à une espèce les connaissances déjà acquises sur l'autre. L'observation de tels hybrides, même en nombre limité valide l'hypothèse ; en revanche, il faut produire un assez grand nombre d'hybrides pour exclure l'hypothèse (non observation du phénotype muté).

## 2.3. Partage d'haplotypes entre races.

On fait ici l'hypothèse que plusieurs races, d'origines géographiques différentes mais ayant le même phénotype, portent une mutation du même gène. Dans ce cas, elles doivent partager une même séquence d'ADN au niveau de ce gène. Cette hypothèse peut être utilisée pour préciser la position du gène et pour confirmer le choix du bon 'candidat'. Ainsi, la connaissance de la séquence du génome permet d'établir une liste dense de polymorphismes de type 'mutation ponctuelle' (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) dans la région déjà identifiée par analyse de liaison. Lorsqu'un gène candidat est supposé, des SNP dans ce gène et autour du gène sont

choisis. Un échantillon d'animaux de races porteuses ou non porteuses du phénotype est alors génotypé afin d'identifier un sous-ensemble de SNP pour lesquels un allèle est commun aux races porteuses de la mutation et est absent dans les races non porteuses. Ce sous-ensemble de SNP, généralement très proches, constitue l'haplotype diagnostic de la présence de la mutation.

La banque d'ADN issue du projet européen AvianDiv a été utilisée pour constituer des panels d'animaux de différentes races portant ou non le génotype muté à l'état homozygote pour les locus *S* ou *W*. Des échantillons de sang ont également été obtenus pour plusieurs espèces sauvages du genre *Gallus* afin d'identifier l'haplotype ancestral.

## 2.4. Approche fonctionnelle

Une fois le gène candidat identifié, il est nécessaire de procéder à l'étude quantitative et qualitative de l'expression du gène. Pour cela, des prélèvements de tissus sont réalisés sur des animaux de génotype connu, issus d'une structure familiale connue, afin de réaliser une comparaison intra-famille entre muté et type sauvage. Il est utile de réaliser aussi des prélèvements d'embryons à différents stades de développement, afin de retracer la mise en place du phénotype. Cependant les phénotypes ne sont pas observables aux stades précoces et il est nécessaire de disposer de familles dans lesquelles la mutation est fixée, afin de s'assurer du génotype des embryons.

Des prélèvements ont été réalisés à l'unité expérimentale pour l'étude des mutations responsables du phénotype 'lavande', 'peau jaune' et 'albinos imparfait'.

Les techniques utilisées vont de l'analyse classique de la taille et de la séquence des ARN messagers à la quantification par PCR en temps réel. Elles ont été utilisées pour la caractérisation de la mutation 'blanc récessif' (Chang et al., 2007).

## 3. RESULTATS

### 3.1. Homologie entre espèces :

La production d'hybrides poules-cailles avait montré que le phénotype de dilution 'lavande' était dû au même gène dans les deux espèces, de même que pour le phénotype d'albinisme lié au sexe (locus *S* du poulet, locus *AL* de la caille). En revanche, le phénotype blanc récessif de poulet n'est pas homologue du phénotype blanc de la caille, qui est donc contrôlé par un autre gène.

Dans le cas de la mutation 'lavande' du poulet, autosomale récessive et responsable d'une dilution des pigments noir et rouge, l'hypothèse d'homologie avec la souris a conduit à cibler l'étude du gène de la mélanophiline (*MLPH*), une protéine constituante du mélanosome, dont une mutation est responsable du

phénotype dilué ‘*leaden*’ de la souris. Cette approche a permis d’identifier une mutation faux-sens dans l’exon 1 du gène *MLPH*. Une mutation dans la même région du gène est associée au syndrome de Griscelli type III chez l’homme (Vaez et al., 2008). La production d’hybrides poule-caille a permis d’établir que le même gène était impliqué chez la caille ‘lavande’ mais l’exon 1 de *MLPH* ne présente pas de mutation, et l’anomalie se situe ailleurs dans le gène.

### 3.2 Analyse de liaison et comparaison entre races

Le locus *S* a été localisé par analyse de liaison avec des marqueurs microsatellites (Gunnarsson et al., 2007); le gène *SLC45A2* (antérieurement *MATP*) a été identifié comme candidat en raison de sa position et de son association à un phénotype de dilution chez le cheval. Ce gène code pour une protéine membranaire impliquée dans le fonctionnement des mélanocytes. Les 7 exons du gène, les introns et des fragments des régions flanquantes, ont été séquencés. La comparaison de séquence entre races argentées ou dorées a permis d’identifier un haplotype de 35 kb conservé entre races argentées, à l’exception de la race Leghorn blanche. Les mutations causales ont ensuite été recherchées. Chacune des mutations phénotypiques a été associée à une anomalie différente du gène *SLC45A2* : une délétion de 1 base (106delT) dans l’exon 1 crée un codon stop prématuré pour l’allèle ‘albinos imparfait’, une substitution nucléotidique dans l’exon 4 conduit au remplacement d’une leucine par une méthionine pour l’allèle ‘argente’ et une autre substitution est propre à la race White Leghorn qui porte un allèle ‘argente’ différent. Deux autres mutations dans le même gène (anomalie d’épissage, mutation faux-sens) ont été trouvées chez la caille (Gunnarsson et al., 2007). Le rôle de la protéine codée par *SLC45A2* étant mal connu, les mutations identifiées peuvent renseigner sur les conséquences fonctionnelles de différentes anomalies de ce gène. Il reste difficile d’expliquer pourquoi les mutations faux-sens suppriment le pigment rouge, selon un déterminisme dominant ou partiellement dominant, alors que la délétion supprime les pigments noir et rouge avec un déterminisme récessif.

### 3.3 Combinaison d’approches

Le locus *W* (peau jaune) a d’abord été localisé sur un microchromosome. Le gène candidat *BCDO2* a été choisi en raison de sa position et de son rôle dans le métabolisme des caroténoïdes. Le génotypage de plusieurs SNP a été réalisé chez 134 animaux issus de races diverses, à peau jaune ou non ; un SNP a été identifié en association complète avec le phénotype. Le reséquençage de cette région du gène a permis d’identifier un haplotype conservé de 23,8 kb entre races à peau jaune (Eriksson et al., 2008).

L’expression du gène a été étudiée grâce aux échantillons prélevés dans la famille informative produite à l’INRA. Le mode d’action de la mutation est une inhibition tissu-dépendante de la transcription : l’allèle responsable du phénotype ‘peau jaune’ n’est pas exprimé dans la peau, où s’accumulent les caroténoïdes, mais est exprimé normalement dans le foie. La mutation causale n’a pas été identifiée. De plus, l’originalité de cette étude a été de montrer que l’haplotype muté provient d’une espèce sauvage, *Gallus sonneratii*, différente de l’espèce *Gallus gallus* habituellement reconnue comme le seul ancêtre sauvage du poulet domestique (Eriksson et al., 2008). Le poulet domestique a donc une origine hybride.

## 4. DISCUSSION

Ces résultats montre l’intérêt de combiner une analyse de liaison dans une grande famille avec la recherche d’un haplotype partagé entre races : la région candidate est rapidement réduite à une petite taille (locus *S*, *W*). La compréhension parfaite du mode d’action de la mutation reste un objectif difficile à atteindre, même une fois que le gène responsable est identifié (locus *S*). La comparaison entre espèces peut apporter des informations très utiles sur le mode d’action (locus *LAV*). Cependant, des résultats décevants ont été obtenus pour le locus *BL* pour lequel l’hypothèse de gène candidat issue de la comparaison avec la caille n’a pas encore été confirmée.

Pour l’ensemble des mutations décrites, il est possible de proposer un test diagnostique moléculaire. Le principe le plus simple est celui d’un test PCR-RFLP, qui combine une amplification PCR avec une digestion enzymatique du fragment amplifié. Soit la mutation crée (ou supprime) un site de coupure enzymatique, soit on « fabrique » une amorce spécifique de l’allèle muté qui porte un site enzymatique. Le choix de la technique dépend à la fois de la nature de la mutation, de la présence éventuelle d’autres polymorphismes dans la région entourant la mutation, et des équipements disponibles. Le choix d’une procédure automatisable dépend aussi du nombre d’échantillons à étudier.

L’état des connaissances actuelles sur les gènes de coloration du poulet est récapitulé au tableau 1. Il serait intéressant de pouvoir y ajouter le locus *FM* (peau noire) et d’aborder le déterminisme des variations de dessin de plumage.

**Tableau 1** – Récapitulation des connaissances actuelles et des travaux en cours sur les gènes de coloration du plumage ou de la peau chez le poulet.

| Locus<br>( nombre de mutations)   | Position chromosomique      | Gène           | Homologie entre espèces | Polymorphisme   | Test diagnostic                          |
|---|-----------------------------|----------------|-------------------------|---|--|
| Développement du mélanocyte : plusieurs gènes candidats chez les mammifères, aucun phénotype identifié chez le poulet |                             |                |                         |   |  |
| Synthèse du pigment   |                             |                |                         |   |  |
| <i>E</i><br>(6)   | Chr GGA13                   | <i>MC1R</i>    | Mammifères<br>oiseaux   | 10 mutations ponctuelles  | Plusieurs méthodes possibles, séquençage |
| <i>C</i><br>(2)   | Chr GGA01                   | <i>TYR</i>     | mammifères              | Une délétion en région codante<br>Une insertion dans l'intron 4 | Pas disponible<br>Disponible             |
| Organisation subcellulaire du pigment, phénotypes de dilution   |                             |                |                         |   |  |
| <i>I</i><br>(3)   | Groupe de liaison E22C19W28 | <i>PMEL17</i>  | Bovin, Souris           | insertion   | possible                                 |
| <i>S</i><br>(2)   | Chr Z                       | <i>SLC45A2</i> | Caille<br>cheval        |   | possible                                 |
| <i>LAV</i><br>(1)   | GGA07                       | <i>MLPH</i>    | Caille, souris          |   | disponible                               |
| <i>IG</i><br>(1)  | Chr GGA06                   | ?              | ?                       |   |  |
| <i>BL</i><br>(1)  | ?                           | ?              | Possible avec la souris |   |  |
| Dessins de plumage  |                             |                |                         |   |  |
| <i>B</i><br>(1)   | Chr Z                       | En cours       | non                     |   |  |
| Coloration de la peau   |                             |                |                         |   |  |
| <i>W</i><br>(1)   | Chr GGA24                   | <i>BCDO2</i>   | non                     | Mutations ponctuelles   | possible                                 |
| <i>ID</i><br>(2)  | Chr Z                       | ?              | ?                       |   |  |

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brumbaugh J.A et al., 1972. J Hered 63:19–25  
 Chang C.M. et al, 2006 BMC Genomics.; 7: 19  
 Chang C.M. et al, 2007 Animal Genetics Volume 38 Issue 2, Pages 162-167  
 Coquerelle G. 2000 « Les poules : diversité génétique visible » Inra Editions, Pages 61-81  
 Eriksson J., et al., 2008. PLoS Genetics, 4(2)  
 Gunnarsson U., et al., 2007. Genetics, 175 : 867- 877  
 Kerje S. et al., 2004 Genetics, 168:1507-1518.  
 Kerje, S., et al 2003 Animal Genetics 34: 241- 248.  
 Minvielle F. et al, 2002. J Hered;93(1):73-6.  
 Smyth, J.R., 1990. in Poultry Breeding and Genetics, Crawford R.D., (ed.), 109-167. Elsevier.  
 Takeuchi S. et al., 1996. Biochim. Biophys. Acta, 1308, 164-168.  
 Tobita-Teramoto T, et al, 2000 Poultr Sci, 79:46-50.  
 Vaez M., et al., 2008. BMC Genetics, 9 : 7