

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. Animaux

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

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

Tableau 2 : Liste des chiens inclus dans l'étude

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

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

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

II. Matériel et méthode

II.1. Ophtalmologie

II.1.1. Examen ophtalmologique

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

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

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

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

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

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

II.1.2. Examen ERG

II.1.2.1. Anesthésie et préparation des animaux

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

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

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

II.1.2.2. Matériel et réglage du matériel

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

Avant de commencer les enregistrements, l'impédance des électrodes était contrôlée pour chaque œil et devait être inférieure à 5 kΩ.

II.1.2.3. Protocole

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

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

L'adaptation à la lumière était réalisée pendant 20 minutes. Le chien était placé sous un tissu occultant. Un flash lumineux achromatique d'intensité de 0,03 cd/m²/s était délivré toutes les 4 minutes (1, 4, 8, 12, 16 et 20 minutes).

Réponse mixte cône/bâtonnet :

Quatre flashes de 3cd/m²/s étaient délivrés en fin d'adaptation à l'obscurité toutes les 10 secondes. Une moyenne de réponses obtenues pour cette stimulation a été déterminée. À partir de la réponse mixte cône/bâtonnet, les potentiels oscillatoires scotopiques ont été extraits après modification de la bande passante du Rétiport.

Evaluation du système photopique :

Le chien était placé en ambiance photopique (30-40cd/m²) pendant 10 minutes. Le fonctionnement des cônes était testé avec 4 flashes d'intensité de 3 cd/m²/s et la moyenne des réponses était établie. La fréquence de stimulation était de 5Hz.

Flicker :

Trente flashes d'intensité de 3 cd/m²/s étaient délivrés à une fréquence de 31 Hz.

II.1.2.4. Analyse statistique des résultats

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

II.2. Génétique

II.2.1. Arbres généalogiques

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

II.2.2. Extraction d'ADN

II.2.2.1. À partir du sang

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

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

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

- TRIS 1 molaire (M) dilué au 1/100 : 10mL ;
- MgCl₂ 1M dilué au 1/200 : 5mL ;
- NaCl 1M dilué au 1/500 : 2mL ;
- H₂O : 983mL.

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

II.2.2.2. À partir de brosettes

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

II.2.3. PCR

II.2.3.1. Dessin des amorces de PCR

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

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

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

	Amorce « forward »	Amorce « reverse »
Int85long	ttgtccatgagggcagttccattc	acatgcctgcctagtcacatacagg

II.2.3.2. Réaction de PCR

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

- eau stérile : 18,8 µL ;
- amorces à 10µM : 0,5+0,5 µL ;
- nucléotides libres (dNTP 10mM) : 0,5 µL ;
- tampon avec MgCl₂ à 1,5 mM concentré 10 fois : 2,5 µL ;
- taq polymérase (QBiogen S.A. France, Courtaboeuf, France) : 0,2 µL ;
- ADN à 20 ng/µL : 2 µL ;
- volume total : 25 µL.

Le programme de PCR utilisé fut le suivant :

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

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

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

Le protocole utilisé était pour une réaction :

- eau stérile : 36,5 µL ;
- amorces à 10µM : 1+1 µL ;
- nucléotides libres (dNTP 10mM) : 1 µL ;
- tampon avec MgCl₂ à 1,5 mM concentré 10 fois : 5 µL ;
- taq polymérase (QBiogen S.A. France, Courtaboeuf, France) : 0,5 µL ;
- ADN à 20 ng/µL : 5 µL ;
- volume total : 50 µL.

Le programme de PCR utilisé fut le suivant :

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

II.2.4. Séquençage

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

II.2.5. Pyroséquençage

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

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

Tout d'abord, un appareil de recueils des monobrans d'ADN a été utilisé (Biotage, Uppsala, Suède : www.biotage.com). Des microbilles recouvertes de streptavidine (40µl) ont été ajoutées à 40µl de produits de PCR. Les billes ont ensuite été récupérées par aspiration sur les tiges d'un peigne. Le peigne a ensuite été plongé dans les trois solutions suivantes pendant 5 secondes à chaque étape :

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

Les billes ont été déposées dans la plaque de 96 puits de pyroséquençage (Biotage) qui contenait le primer de séquençage à 1,6 µM en solution dans 40 µl de tampon de séquençage (Biotage). Cette plaque a été placée à 90°C pendant 2 minutes pour achever la dénaturation. La plaque a été placée dans le pyroséquenceur (PSQ96, Biotage) et a été assortie d'une cartouche contenant :

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

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

II.2.6. Logiciels utilisés

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

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

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

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

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

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

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

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

III. Résultats

III.1. Etude ophtalmologique

III.1.1. Examen ophtalmologique

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

Figure 30 : Couleur des iris du beagle HOB2628



Œil droit



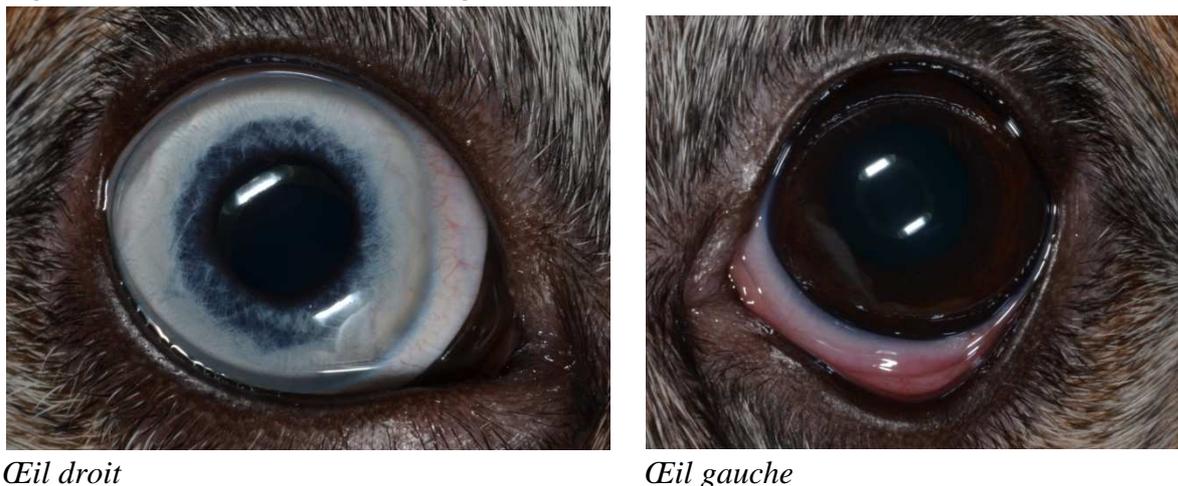
Œil gauche

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

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

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

Figure 31 : Couleur des iris du beagle HOG3700



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

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

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

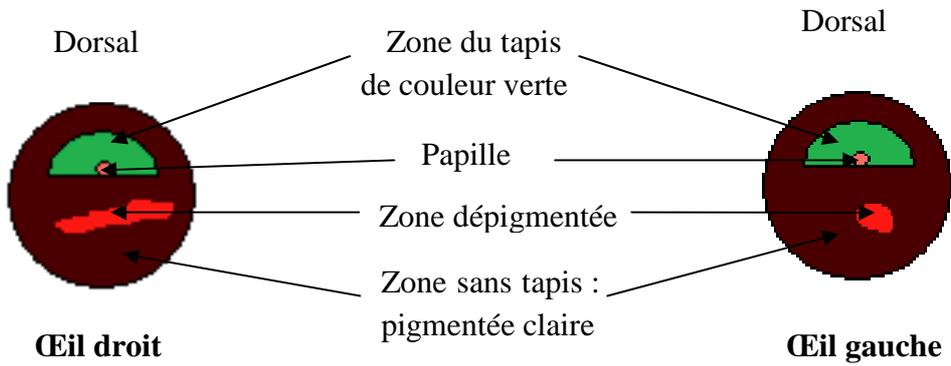
+ : indique une réponse présente

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

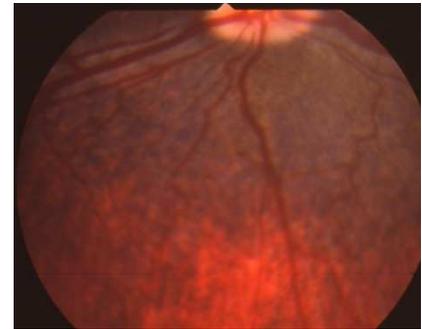
Beagle	Test de Schirmer (en mm/min)		Pression intraoculaire (mmHg)	
	Œil droit	Œil gauche	Œil droit	Œil gauche
HOB 2628	20	22	17	20
HOG 3700	27	24	17	17
H9L 2210	19	15	19	21
HOB 2357	25	18	17	19
H2F 1072	12	13	Non réalisé	Non réalisé
H2E 0725	15	15	16	17
H2F 1068	18	15	20	23
NEO	20	10	21	21
7304871	22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

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

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



Fond d'œil à droite de HOB2628

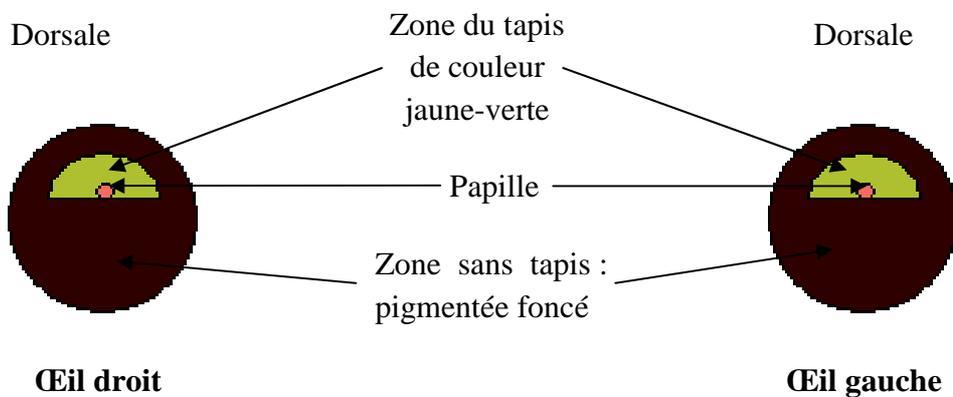


Fond d'œil à gauche de HOB2628

Photos : Unité d'ophtalmologie, CHUVA, ENVA.

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

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



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

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

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

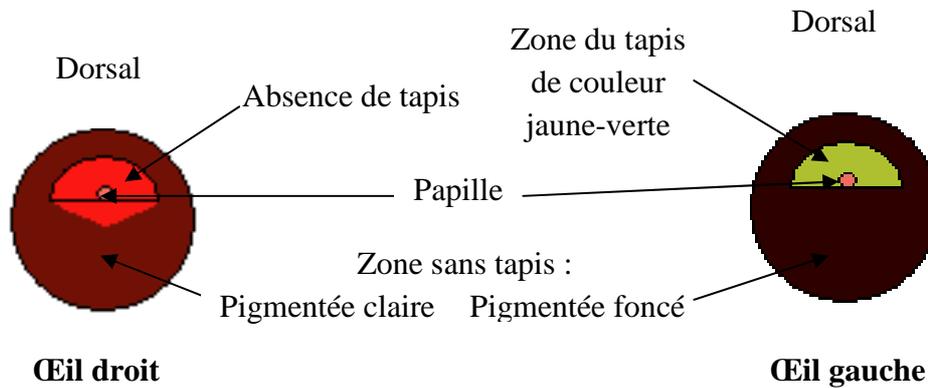
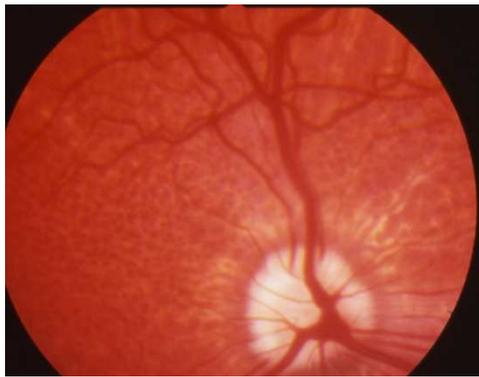
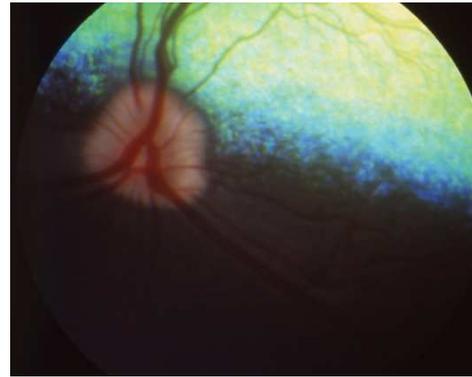


Figure 34 : Fonds d'œil du beagle H9L2210



Fond d'œil à droite



Fond d'œil à gauche

Figure 35: Fonds d'œil du beagle HOG3700



Fond d'œil à droite

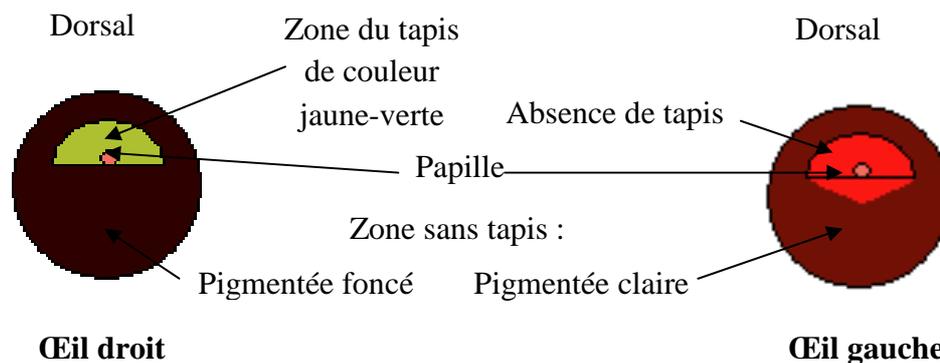


Fond d'œil à gauche

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

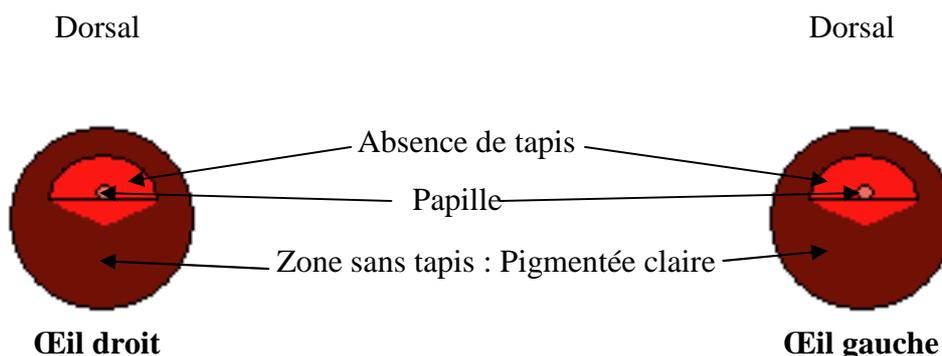
Les fonds d'œil à droite des beagles 1907192NYAA et H2E0725 possédaient une zone du tapis de couleur jaune-vert et une zone sans tapis pigmentée de couleur marron foncé. Les fonds d'œil à gauche des beagles 1907192NYAA et H2E0725 présentaient une zone dépigmentée en position dorsale avec absence de tapis,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

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



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

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

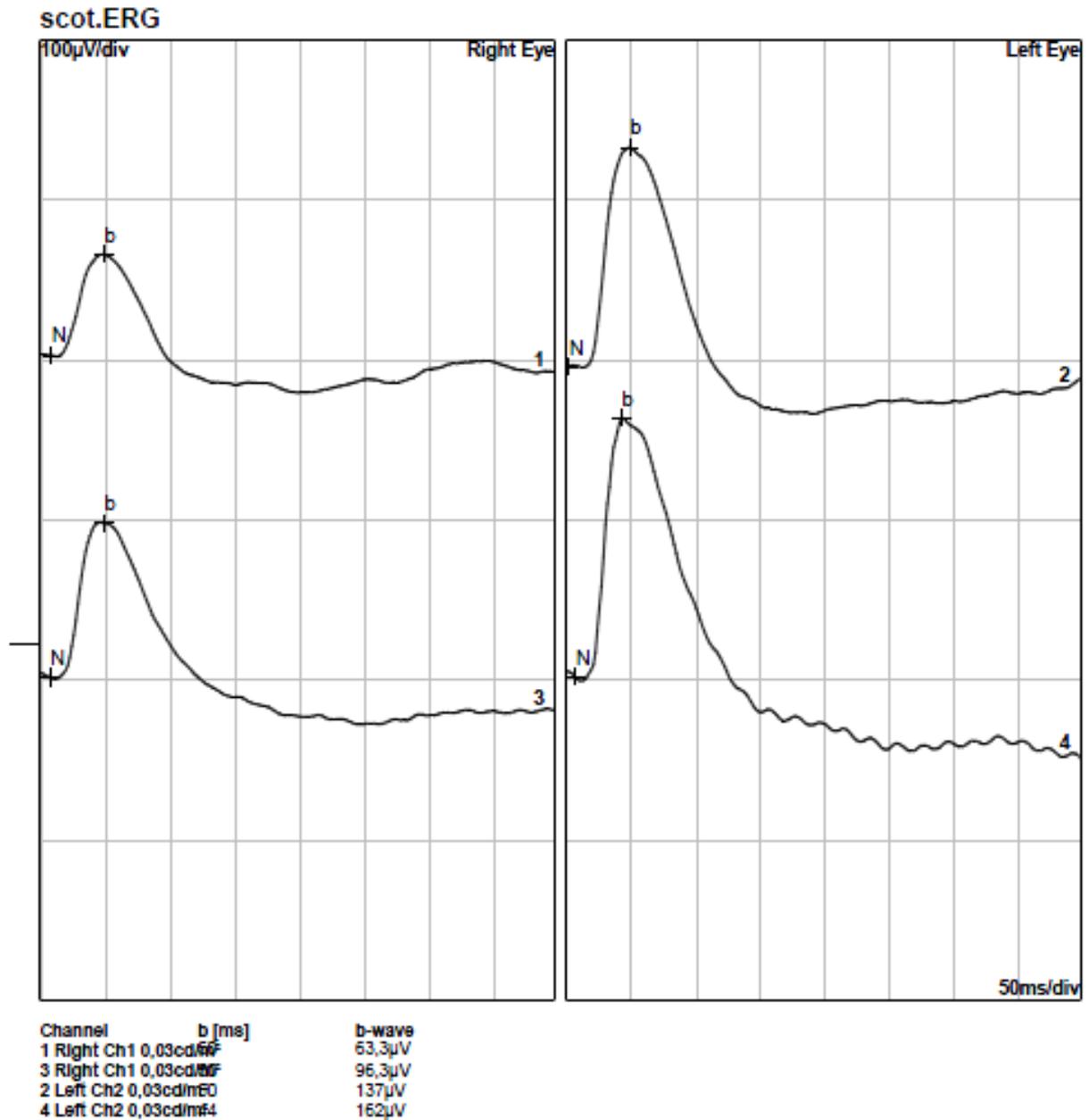


III.1.2. Examen ERG

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

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

RETiport32	Hospital / Praticien Name Address		
	Patient: Beagleux, H2E0726	Sex/Age: F/	Electrode: ERG-JET
	Tested: 22/07/2013 10:56:53	Operator:	Pupil Size: dil.
	ID:		



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

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

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

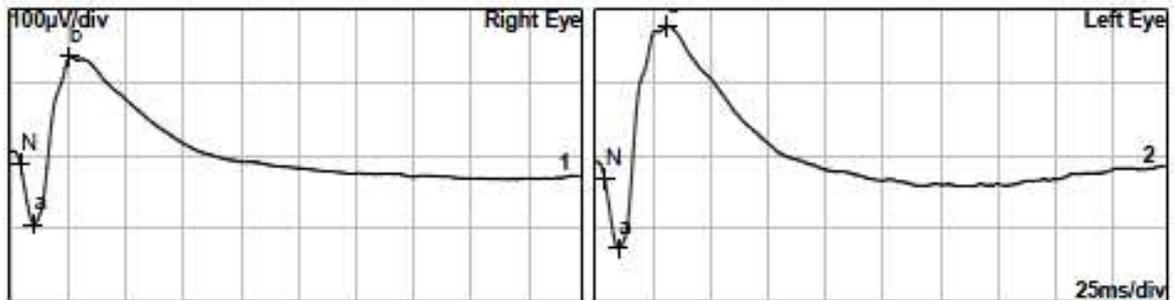
Courbe 4 : obtenue pour l'œil gauche en scotopique avec adaptation.

b : onde b, N : ligne de base

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

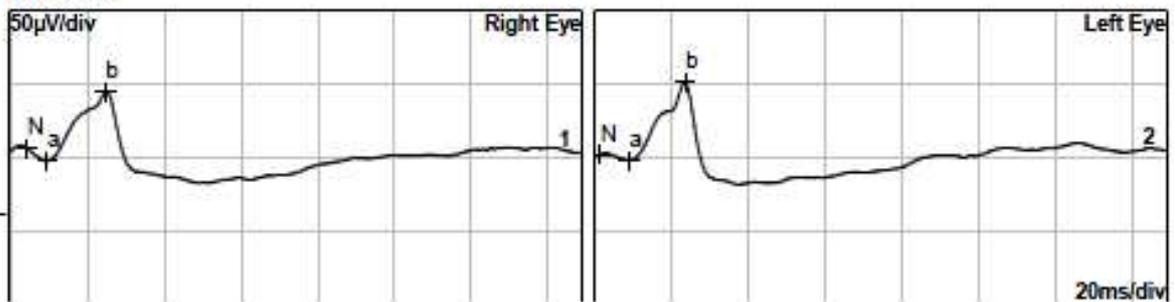
RETiport32 	Hospital / Praticien Name Address		
	Patient: Beagleux, H2E0725 Tested: 22/07/2013 10:56:53 ID:	Sex/Age: F/ Operator:	Electrode: ERG-JET Pupil Size: di.

Scot. Mix R.



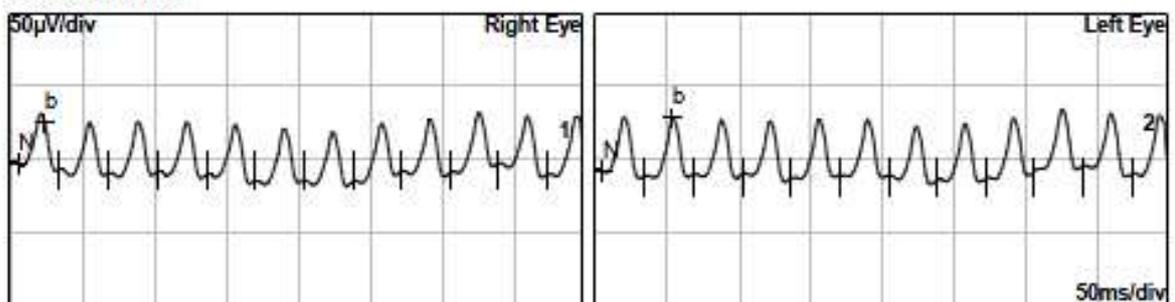
Channel	a [ms]	b [ms]	a-wave	b-wave
1 Right Ch1 3cd/m ² 11	26	81,8µV	228µV	
2 Left Ch2 3cd/m ² 11	32	95,5µV	303µV	

Phot.R.



Channel	a [ms]	b [ms]	a-wave	b-wave
1 Right Ch1 3cd/m ² 10	25	6,58µV	47,5µV	
2 Left Ch2 3cd/m ² 9	24	3,81µV	53,2µV	

Cone Flicker



Channel	b [ms]	b-wave
1 Right Ch1 3cd/m ² 25	28µV	
2 Left Ch2 3cd/m ² 55	36,5µV	

Courbe en haut à droite : obtenue pour l'œil droit en scotopique à 3cd/m².

Courbe en haut à gauche : obtenue pour l'œil gauche en scotopique à 3cd/m².

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lot subalbinos avec tapis						
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique sans adaptations</i>	<i>Scotopique avec adaptation</i>	<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Intensité Flash cds/m2		0,03	0,03	3	3	3
Chien	Fond d'œil					
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	48,8	65,9	203	41,9	30,8
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	31,7	47,8	114	26,5	8,27
Moyenne		40,25	56,85	158,50	34,20	19,54
Écart-type		12,09	12,80	62,93	10,89	15,93

OD : œil droit, OG : œil gauche.

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

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

	<i>Scotopique sans adaptations (0,3 cds/m2)</i>	<i>Scotopique avec adaptation (0,3 cds/m2)</i>	<i>Scotopique (3 cds/m2)</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Valeur de Z	0,516	0,904	0,452	0,904	0,129
Valeur de p	0,6056	0,3662	0,6514	0,3662	0,8973

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

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

Temps Culmination de l'onde b (ms)						
Lot témoins						
Ambiance		Scotopique sans adaptations	Scotopique avec adaptation	Scotopique	Photopique	Flicker
Intensité Flash cds/m2		0,03	0,03	3	3	3
Chien	Fond d'œil					
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	55	50	32	28	58
H9L2210-OG	pigmenté avec tapis	56	50	34	26	25
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	50	50	26	25	25
HOG3700-OG	pigmenté avec tapis	52	52	36	25	55
HOB2357-OG	pigmenté avec tapis	41	53	32	24	22
H2F1068-OG	pigmenté avec tapis	44	52	27	25	56
Moyenne		49,67	51,17	31,17	25,50	40,17
Écart-type		6,02	1,33	3,92	1,38	17,77

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

Lot subalbinos sans tapis						
Ambiance		Scotopique sans adaptations	Scotopique avec adaptation	Scotopique	Photopique	Flicker
Intensité Flash cds/m2		0,03	0,03	3	3	3
Chien	Fond d'œil					
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	47	49	33	26	56
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	49	52	36	25	56
Moyenne		48,00	50,50	34,50	25,50	56,00
Écart-type		1,41	2,12	2,12	0,71	0,00

OD : œil droit, OG : œil gauche.

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

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

	Scotopique sans adaptations (0,3 cds/m2)	Scotopique avec adaptation (0,3 cds/m2)	Scotopique (3 cds/m2)	Photopique	Flicker
Valeur de Z	0,452	1,807	0,258	1,485	0,710
Valeur de p	0,6514	0,0707	0,7963	0,1376	0,4777

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

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

Amplitude de l'onde a (microvolts)			
Lot témoin			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m2</i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	81,8	8,58
H9L2210- OG	pigmenté avec tapis	49,5	5,15
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	55,6	7,57
HOG3700- OG	pigmenté avec tapis	63,5	4,8
HOB2357- OG	pigmenté avec tapis	70,1	3,98
H2F1068- OG	pigmenté avec tapis	82,5	6,22
Moyenne		67,17	6,05
Écart-type		13,54	1,75
Lot subalbinos sans tapis			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m2</i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OG	peu pigmenté sans tapis	95,5	3,81
H9L2210- OD	peu pigmenté sans tapis	47,2	6,55
Falcon-OD	dépigmenté sans tapis	105	19,7
HOG3700- OD	peu pigmenté sans tapis	64,1	10,3
HOB2357- OD	peu pigmenté sans tapis	83,2	11,9
Atchoum- OD	dépigmenté sans tapis	129	17,6
Atchoum- OG	dépigmenté sans tapis	111	4,89
H2F1068- OD	modérément pigmenté sans tapis	54,2	5,9
Moyenne		86,15	10,08
Écart-type		29,10	5,96

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

OD : œil droit, OG : œil gauche.

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

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

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

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

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

Temps Culmination de l'onde a (ms)			
Lot témoins			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m2</i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OD	pigmenté avec tapis	11	10
H9L2210- OG	pigmenté avec tapis	12	7
Falcon-OG	pigmenté avec tapis	12	11
HOG3700- OG	pigmenté avec tapis	14	9
HOB2357- OG	pigmenté avec tapis	12	11
H2F1068- OG	pigmenté avec tapis	12	10
Moyenne		12,17	9,67
Écart-type		0,98	1,51
Lot subalbinos sans tapis			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m2</i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
H2E0725 OG	peu pigmenté sans tapis	11	9
H9L2210- OD	peu pigmenté sans tapis	12	10
Falcon-OD	dépigmenté sans tapis	12	11
HOG3700- OD	peu pigmenté sans tapis	12	12
HOB2357- OD	peu pigmenté sans tapis	13	11
Atchoum- OD	dépigmenté sans tapis	12	12
Atchoum- OG	dépigmenté sans tapis	12	18
H2F1068- OD	modérément pigmenté sans tapis	12	11
Moyenne		12,00	11,75
Écart-type		0,53	2,71

Lot subalbinos avec tapis			
<i>Ambiance</i>		<i>Scotopique</i>	<i>Photopique</i>
<i>Intensité Flash cds/m2</i>		3	3
<i>Chien</i>	<i>Fond d'œil</i>		
HOB2628-OG	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	11	11
HOB2628-OD	pigmenté claire avec plage dépigmentée avec tapis	12	9
Moyenne		11,50	10,00
Écart-type		0,71	1,41

OD : œil droit, OG : œil gauche.

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

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

	<i>Scotopique (3 cds/m2)</i>	<i>Photopique</i>	<i>Flicker</i>
Valeur de Z	0,065	1,743	0,710
Valeur de p	0,9485	0,0814	0,4777

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

III.2. Pelage

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

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

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

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

Figure 40 : Photo du chien HOG3700



Figure 41 : Photo du chien 1907192NYAA



Figure 42 : Photo du chiot mâle de Turquoise-Saphir



Figure 43 : Photo du chiot femelle de Turquoise-Saphir

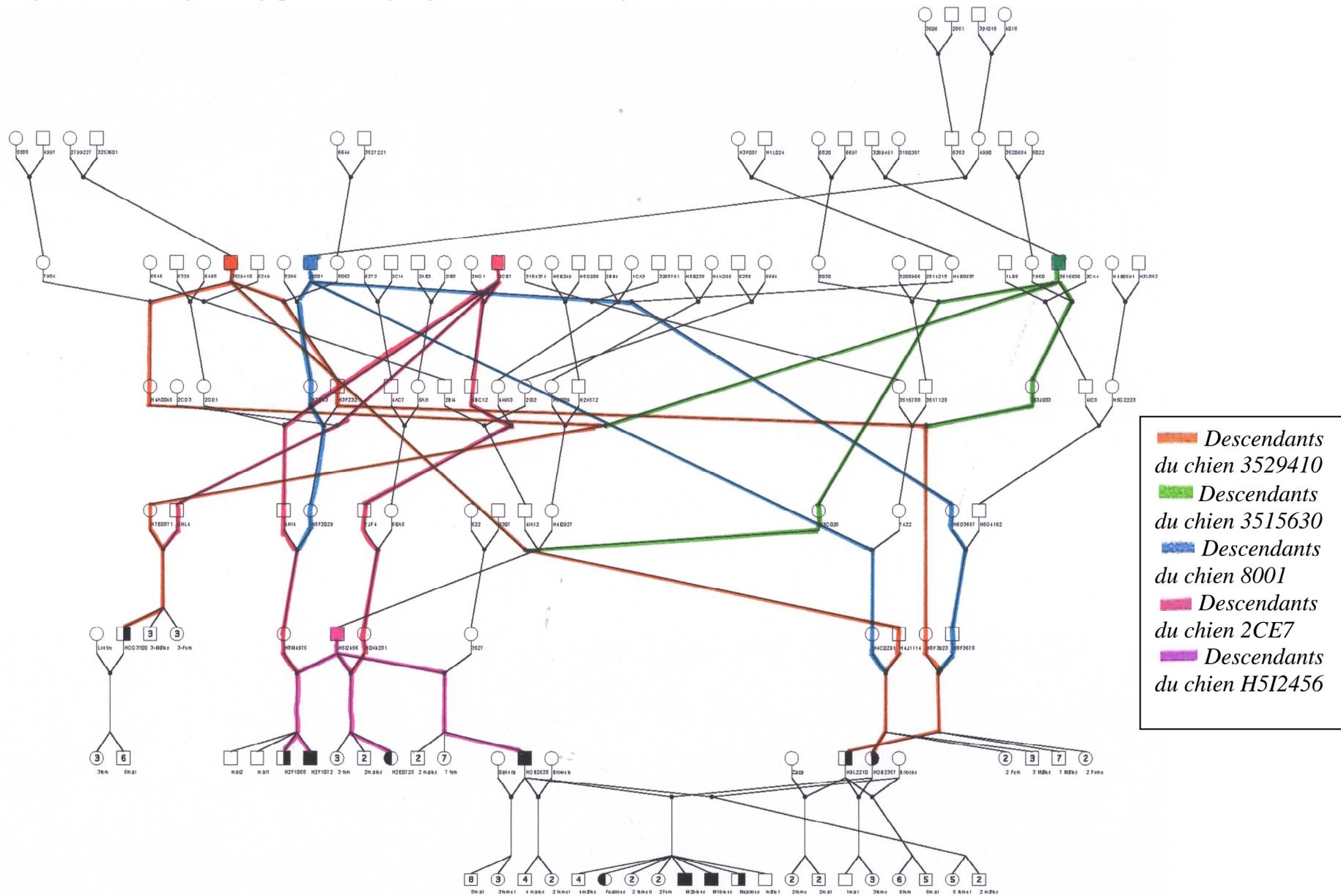


III.3. Génétique

III.3.1. Identification du mode de transmission

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

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



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

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

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

Tableau 15 : Croisements réalisées à l'ENVA

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

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

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

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

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

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

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