

Carte génétique du lapin: état des lieux et perspectives

C. CHANTRY-DARMON^{1,2}, C. URIEN¹, H. DE ROCHAMBEAU³, D. ALLAIN³,
B. PENA³, G. BOLET³, H. GARREAU³, H. HAYES², M. BERTAUD², C. GROHS²,
S. CHADI-TAOURIT², S. DERETZ-PICOULET⁴, C. LARZUL⁵, J.C. SAVE¹,
E. P. CRIBIU², P. CHARDON¹, C. ROGEL-GAILLARD¹

¹Laboratoire de Radiobiologie et Etude du Génome, UMR INRA CEA 314, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

²Laboratoire de Génétique biochimique et Cytogénétique, INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

³Station d'Amélioration Génétique des Animaux, INRA, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

⁴G.E.P.A. INRA Le Magneraud, 17700 Surgères, France

⁵Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France,

Résumé. L'INRA a engagé un programme de cartographie du génome du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) en décembre 2001. L'objectif était de baliser le génome avec des marqueurs microsatellites ayant une localisation chromosomique connue, cette approche permettant de construire directement une carte intégrée génétique et cytogénétique. Parmi 305 séquences microsatellites isolées, 183 ont un ancrage cytogénétique. Des familles de 3 générations ont été produites et génotypées. Les marqueurs polymorphes présentent de 2 à 7 allèles, avec une moyenne de 3,3. La carte génétique s'étend sur 2729 cM et couvre 21 des 23 chromosomes du lapin. Elle comprend 93 marqueurs répartis en 21 groupes de liaison et 18 marqueurs polymorphes singleton avec une position cytogénétique. De densité encore limitée, cette carte, validée par la localisation des caractères angora et albinos, en ségrégation dans les familles, permet de développer la recherche de marqueurs, de gènes ou de QTL pour des caractères d'intérêt chez le lapin.

Abstract. Genetic map of the Rabbit : state of the art and perspectives. A mapping project of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genome has been launched by the INRA institute in December 2001. The aim was to mark out the genome with microsatellites having a cytogenetic position, in order to directly build an integrated genetic and cytogenetic map. Among 305 newly isolated microsatellite sequences, 183 are anchored onto the cytogenetic map. Three generation rabbit families were produced and genotyped. Polymorphic markers harboured between 2 and 7 alleles with an average of 3,3. The genetic map spans 2729 cM and covers 21 of the 23 rabbit chromosomes. The map comprises 93 markers distributed in 21 linkage groups mapping to 18 distinct chromosomes and 18 single polymorphic markers with a precise cytogenetic position. The density of the existing map is still limited. However, this map, as it was shown by the localization of the angora and albinos genes segregating in the reference families, will allow developing the research of markers, genes or QTL for zoo technical traits in the rabbit.

Introduction

Le lapin est une espèce d'intérêt pour la production agricole, la recherche biomédicale et comme animal de compagnie. Le lapin a été utilisé en recherche depuis le début du XX^{ème} siècle, en particulier en physiologie et immunologie. Toutefois, cette espèce a été en quelque sorte marginalisée au cours des 20 dernières années lors de l'avènement des programmes ambitieux de cartographie qui se sont concentrés sur l'homme, les espèces pilotes en recherche biomédicale, comme la souris et le rat, et les espèces de rente principalement étudiées à l'INRA, comme les bovins, le porc et le poulet. Il a été démontré ces dernières années que le développement de la cartographie à l'échelle de génomes entiers est une pierre angulaire pour l'identification de régions chromosomiques contenant des gènes pouvant expliquer tout ou partie de la variabilité des caractères à déterminisme génétique. De plus, étant donné que l'effort majeur concerne l'espèce humaine avec le séquençage et l'annotation de son génome, il est déterminant de pouvoir exploiter les données disponibles chez l'homme pour pallier le

nombre plus restreint d'informations dans l'espèce étudiée. C'est l'enjeu de la cartographie comparée qui permet de transposer des informations d'une espèce à une autre.

Dans le but de démarrer la recherche de régions candidates pour des caractères d'intérêt comme la prolificité, la résistance à des agents pathogènes, les qualités maternelles, l'INRA a engagé, en 2001, un programme de cartographie du génome du lapin (Chantry-Darmon *et al.*, 2003a). A cette époque n'étaient publiées que des données disparates de cartographie avec 77 marqueurs de natures différentes (biochimiques, morphologiques, moléculaires) répartis en 15 groupes de liaison dont seulement 7 étaient ancrés sur des chromosomes (Fox, 1994). L'objectif a donc consisté à produire une carte avec des marqueurs de nature homogène, des microsatellites. De plus, afin de bénéficier d'une carte qui fournisse des informations précises de cartographie comparée avec l'homme, nous avons développé simultanément une carte intégrée cytogénétique et génétique (Chantry-Darmon *et al.*, 2003a). A ce jour ont été localisés 248 nouveaux

gènes sur tous les chromosomes de lapin (Chantry-Darmon *et al.*, 2003b et 2005a) et parmi 305 séquences microsatellites nouvellement isolées, 183 ont une localisation cytogénétique (Chantry-Darmon *et al.*, 2005b). L'objectif initial de couvrir l'ensemble du génome du lapin avec 150 à 300 marqueurs, soit un marqueur tous les 10 à 20 cM, est partiellement atteint.

1. Matériel et Méthodes

1.1 Familles de référence

Trois souches INRA de lapins ont été utilisées pour construire les familles, la souche INRA 2066, la souche Orylag® Castor, et la souche Laghmere. Des mâles INRA 2066 (n=5) ont été croisés avec des femelles Laghmere (n=8) et des mâles Laghmere (n=3) avec des femelles Orylag (n=4). Les femelles F1 (n=8), issues du premier croisement, ont été croisées avec les mâles F1 (n=8), issus du deuxième croisement, pour obtenir les lapins F2 (n=151). Les lapins F2 ont été phénotypés pour la longueur et la couleur de leur pelage. Le sexe des animaux a été enregistré et les mesures suivantes effectuées : poids individuels à 63 jours, longueur minimale et maximale du pelage, diamètre moyen du poil. La population de référence comprend 187 animaux répartis en 8 familles de trois générations.

1.2 Préparation des ADN pour le génotypage

Un échantillon de 8 ml de sang a été prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie et transféré dans deux tubes stériles contenant de l'EDTA (K3 EDTA, Vacutainer®B-D). Les globules rouges ont été lysés avec une solution composée de chlorure de sodium 10 mM et d'EDTA 10 mM à pH 7,5 (Solution NE) pendant une nuit sous agitation à 4°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 20 minutes à 1000g et des séries de lavage avec du tampon NE et des centrifugations ont été effectuées jusqu'à obtention d'un culot de lymphocytes. Les culots de lymphocytes ont été conservés à -20°C avant extraction d'ADN. L'ADN de chaque individu a ensuite été quantifié puis conservé à -20°C.

1.3 Génotypage des animaux

Une technique économique, décrite par Schuelke (2000), a été mise au point. La réaction de PCR est réalisée avec trois amorces : une amorce directe spécifique du locus à amplifier mais allongée d'une queue universelle de 17 nucléotides (5'-GACCGGCAGCAAAATTG-3'), une amorce reverse spécifique du locus et l'amorce universelle de 17 nucléotides, utilisée comme deuxième amorce directe, marquée en 5' par un fluorochrome (6-Fam, Hex ou Tet). Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 15 µl contenant les réactifs enzymatiques de PCR, 20 ng d'ADN, 0,05 µM de l'amorce directe allongée, 0,2 µM de l'amorce reverse et 0,2 µM de l'amorce universelle. Les conditions de PCR suivantes ont été utilisées pour tous les marqueurs : 94°C 30s (94°C 15s; 61°C 30s) x 3; (94°C 15s; 59°C 30s) x 3; (94°C 15s; 57°C 30s) x 3; (95°C 15s ; 55°C 30s; 72°C 30s) x 35 et 72°C 10min.

Les résultats ont été interprétés avec le logiciel Genetic Profiler v1.1 (séquenceur ABI Prism 377A) ou Genotyper (séquenceur Megabace 1000).

1.4 Construction de la carte

Les données de génotypage sont compilées dans la base de données MAPGENA du département de Génétique Animale de l'INRA. Les phénotypes angora et albinos, en ségrégation dans les familles, ont été exploités comme des marqueurs morphologiques. Le logiciel CRI-MAP version 2.4 a été utilisé pour construire la carte. Dans un premier temps, la liste des marqueurs liés est obtenue par analyse deux points. Dans un deuxième temps, les groupes de liaison ont été étudiés par des analyses multipoints. L'exploitation conjointe des informations de cytogénétique a confirmé des ordres ou permis de lier des marqueurs isolés ou peu informatifs.

2. Résultats et discussion

2.1 Identification des microsatellites

Un total de 305 séquences microsatellites a été nouvellement identifié, parmi lesquelles 183 ont une position cytogénétique (Chantry-Darmon *et al.*, 2005b). La carte cytogénétique des microsatellites couvre tous les chromosomes, à l'exception du chromosome 21. Ces séquences ont été soumises à la base de données internationale DDBJ/EMBL/GENBANK, avec les numéros d'accèsion AJ874368 à AJ874672.

2.2 Polymorphisme des microsatellites

Le polymorphisme des 305 séquences microsatellites a été testé sur les 16 animaux F1 des familles de référence. Dans nos conditions expérimentales, 199 couples d'amorces amplifient les ADN par PCR et, parmi ces 199 microsatellites, 161 (81%) sont polymorphes, avec de 2 à 7 allèles (3,3 en moyenne). Ce nombre limité d'allèles était prévisible car les familles ont été conçues avec des souches INRA possédant des origines communes et il avait déjà été rapporté un faible nombre d'allèles par locus microsatellite dans les populations de lapins domestiques (Queney *et al.*, 2001). Le taux d'hétérozygotie des microsatellites a été estimé à 52%, ce qui est comparable aux taux d'hétérozygotie des microsatellites observés pour d'autres mammifères. Nous avons également inclus 5 microsatellites déjà publiés, localisés sur 5 chromosomes différents (Korstanje *et al.*, 2001 et 2003). Les 187 lapins des familles de référence ont été génotypés pour ces 166 marqueurs polymorphes.

2.3 Groupe de liaisons et ancrage sur les chromosomes

La carte génétique, construite avec le logiciel CRI-MAP, comprend un total de 113 marqueurs, soit 106 microsatellites INRA, 5 microsatellites publiés et deux marqueurs phénotypiques angora et albinos. Dans un premier temps, une analyse deux-points a regroupé les marqueurs par deux. Ensuite, pour ordonner les marqueurs dans un même groupe de liaison et déterminer les distances génétiques qui les

séparent, des analyses multipoints, conjointement à des analyses qui permettent de déterminer l'ordre le plus probable entre les marqueurs, ont été réalisées.

Ces différentes analyses ont été conduites avec un LOD score de 3 abaissé à 1,8 dans les quelques cas où la position cytogénétique des marqueurs permettait de confirmer la liaison. Quatre vingt treize marqueurs sont liés dans 21 groupes de liaisons ancrés sur 18 chromosomes. Ces groupes de liaison sont constitués de 2 à 10 marqueurs, distants en moyenne de 24,1 cM. Dix-huit marqueurs singleton ont une localisation cytogénétique

2.4 Densité de la carte et couverture du génome

La carte actuelle comprend des marqueurs génétiques sur tous les chromosomes, à l'exception des chromosomes 20 et 21. Parmi les 21 chromosomes couverts sur les 23, 18 chromosomes présentent 1 ou plusieurs groupes de liaison et 3 chromosomes (7, 10 et Y) des marqueurs singleton. La carte couvre 2729 cM et correspond à une moyenne entre les cartes mâle et femelle, calculée par le logiciel CRI-MAP. D'une taille probablement surestimée par le mode de calcul, la carte couvre toutefois près de 90 % du génome du lapin et assure un balisage régulier. Le nombre limité d'allèles n'a pas freiné l'utilisation des marqueurs et la perte de certains d'entre eux est, en partie, due à l'absence de répétition des expériences de génotypage et à la technique des amorces allongées qui génère des pertes mais permet d'obtenir des résultats à coût très réduit. Il existe donc une réserve importante de marqueurs à génotyper dans des conditions plus efficaces, pour augmenter la densité de cette carte de première génération.

L'effort suivant consistera à saturer en marqueurs les régions du génome qui seront identifiées comme candidates pour les caractères étudiés. Le National Human Genome Research Institute américain a annoncé le séquençage partiel du génome du lapin en août 2004, avec celui de 8 autres mammifères (<http://www.nih.gov/news/pr/aug2004/nhgri-04.htm>). Les séquences brutes sont mises à disposition dans les bases de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et seront un atout pour les futurs projets de cartographie du génome du lapin.

2.5 Primo localisation des caractères *angora* et *albinos*

Le caractère *angora* est positionné, par une analyse deux points, à 3 cM du marqueur INRACCDDV0288, avec un LOD score de 7,63. Il est inclus dans un groupe de liaison ancré sur le bras q du chromosome 15, à 4,8 et 20,7 cM des marqueurs les plus proches en analyse multipoints. Le gène FGF5, connu pour être impliqué dans le caractère *angora* chez la souris, est localisé sur le chromosome humain 4q21.21 (Ensemble Human Genome Browser 27.35a.1) qui correspond, d'après la carte comparée homme lapin, au bras q du chromosome 15 de lapin. Nos résultats sont compatibles avec les travaux de Mulsant et collaborateurs (2004) qui ont montré une forte liaison entre le caractère *angora* et le gène FGF5 chez le lapin. Aucune mutation causale dans le gène FGF5

n'a encore été mise en évidence (Quatrain et Oulmouden, communication personnelle) mais il semble établi que le gène FGF5 ou un gène physiquement proche est impliqué dans le caractère *angora* chez le lapin.

Le caractère *albinos* est lié en deux points au marqueur DIUtr4, à une distance de 14 cM et avec un LOD score de 18,62. En analyse multipoints, il est cartographié dans un groupe de liaison ancré sur le chromosome 1 de lapin, à 25,2 et 16 cM des marqueurs les plus proches. Chez la souris, le gène tyrosinase (TYR) est impliqué dans le caractère *albinos*. Or, nous avons localisé le gène TYR sur le chromosome 1 du lapin, en position q14-q15, à un locus très proche de celui trouvé par cartographie génétique. Fox (1994) a positionné le caractère *albinos* dans le groupe de liaison I ultérieurement ancré sur le chromosome 1 de lapin (Korstanje *et al.*, 2001). Nos résultats confirment la cartographie du locus *albinos* sur le chromosome 1. L'implication du gène TYR dans ce caractère reste encore à démontrer.

3. Perspectives d'utilisation de la carte

La cartographie n'est qu'une première étape qui ouvre la voie à la recherche de gènes intéressants situés dans les intervalles séparant les marqueurs. L'approche classique de la sélection, qui s'intéresse à la valeur globale du génome (valeur génétique), sans prendre en compte l'effet individuel de chaque gène, peut s'avérer peu efficace ou coûteuse dans certaines situations : faible héritabilité, mesure tardive, difficile ou coûteuse des caractères de sélection. Il devient alors intéressant de considérer le ou les quelques gènes ayant une forte influence sur les caractères quantitatifs. La détection de ces gènes fait l'objet de nombreux travaux dans d'autres espèces. Le principe repose sur l'observation de différences de performances entre des groupes d'individus en fonction de leur génotype au(x) marqueur(s) (Le Roy, 2001). Des dispositifs expérimentaux spécifiques, basés sur le croisement de populations phénotypiquement différentes, doivent être mis en place pour accroître les chances de détecter des QTL (Bidanel *et al.*, 1998). En l'absence d'une carte génétique, peu de travaux ont encore été menés dans cette direction. Ils ont principalement concerné des caractères liés à la reproduction (Bosze *et al.*, 2002, Merchan *et al.*, 2005). Des projets concernant la reproduction, l'efficacité alimentaire ou la résistance aux maladies sont à l'étude. Chez le lapin, la très importante variabilité génétique observée, allant des souches sélectionnées aux races patrimoniales (Bolet *et al.*, 2002) et aux populations sauvages permet d'envisager facilement des programmes de détection basés sur des populations fortement divergentes. Toutefois, contrairement à d'autres espèces, la faible valeur unitaire pénalise l'intérêt économique de ces travaux. La perspective la plus intéressante dans ce domaine est l'introgession de gènes assistée par marqueurs pour des caractères difficiles à améliorer par les méthodes classiques de sélection. En raison du coût engendré par les multiples pathologies des

élevages cunicoles et de la volonté des pouvoirs publics de réduire l'utilisation d'antibiotiques, la sélection pour la résistance aux maladies est aujourd'hui un axe privilégié de recherche. Toutefois, avant de rechercher les gènes de résistance ou de susceptibilité, nous devons aujourd'hui poursuivre les travaux permettant de mesurer précisément la résistance des lapins aux pathologies majeures (pasteurellose) et de mieux connaître les agents pathogènes responsables (Entéropathie épizootique).

Conclusion

L'objectif de ce travail a été d'obtenir une carte intégrée génétique et cytogénétique de première génération applicable à la localisation de caractères d'intérêt. La stratégie choisie a consisté à construire une carte génétique avec des microsatellites directement ancrés sur les chromosomes de lapin et à enrichir simultanément la carte cytogénétique en gènes et en microsatellites, la carte génétique et la carte comparée homme lapin. Notre travail est un apport significatif à la cartographie du génome du lapin. La carte actuelle, bien que de densité encore faible, a été validée par la localisation des caractères angora et albinos, à des positions en accord avec les données disponibles par ailleurs. Les régions non encore couvertes du génome doivent être enrichies, afin de développer la recherche de marqueurs, de gènes ou de QTL pour des caractères d'intérêt zootechnique, mais aussi biomédical, chez le lapin.

Remerciements

Le travail de thèse de Céline Chantry-Darmon sur ce projet a été co-financé par le département de Génétique Animale de l'INRA et le SYSELAF. Nous remercions vivement André Neau pour la gestion des données de génotypage dans la base MAPGENA.

Références

BIDANEL J.P., MILAN D., CHEVALET C., WOLOSZYN N., BOURGEOIS F., CARITEZ J.C., GRUAND J., LE ROY P., BONNEAU M., LEFAUCHEUR L., MOUROT J., PRUNIER A., DESAUTES C., MORMEDE P., RENARD C., VAIMAN M., ROBIC A., GELLIN J., OLLIVIER L. 1998. Détection de locus à effets quantitatifs dans le croisement entre les races porcines Large White et Meishan. Dispositif expérimental et premiers résultats. *30èmes Journées de la Recherche porcine en France*, 109-116.

BOLET G., MONNEROT M., BESENFELDER U., BOSZE S., BOUCHER S., FERRAND N., HEWITT G., JOLY T., LECHEVESTRIER S., LOPEZ M., MASOERO G., VAN DER LOO W., VICENTE J., VIRAG G., Inventory, characterisation and conservation of European rabbit genetic resources. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock*

Production, Montpellier, France, August 19-23, 2002, Communication N° 04-11

- BOSZE Z.S., BOLET G., MESZAR Z., VIRAG G.Y., DEVINOY E., Relation between litter size and kappa casein genotype in INRA rabbit lines. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, August 19-23, 2002, Communication N° 08-10.
- CHANTRY-DARMON C., HAYES H., DE ROCHAMBEAU H., ROGEL-GAILLARD C. 2003a. Cartographie chez le lapin : état des lieux. *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France, 19-20/11/2003,
- CHANTRY-DARMON C., ROGEL-GAILLARD C., BERTAUD M., URIEN C., PERROCHEAU M., CHARDON P., HAYES H. 2003b. 133 new gene localizations on the rabbit cytogenetic map. *Cytogenet. Genome Res.*, 103(1-2), 192-201.
- CHANTRY-DARMON C., ROGEL-GAILLARD C., BERTAUD M., URIEN C., PERROCHEAU M., HAYES H., CHARDON P., HAYES H. 2005a. Expanded comparative mapping between man and rabbit and detection of a new conserved segment between HSA22 and OCU4. *Cytogenet. Genome Res.*, 11, 134-139.
- CHANTRY-DARMON C., URIEN C., HAYES H., BERTAUD M., CHADI-TAOURIT S., CHARDON P., VAIMAN D., ROGEL-GAILLARD C. 2005b. Construction of a cytogenetically anchored-microsatellite map in rabbit. *Mamm. Genome*, 16, 442-459.
- FOX R.R. 1994. Taxonomy and genetics. In: *The Biology of the Laboratory Rabbits*, 2^{ème} édition, 1-25. Editeurs Manning P.J., Ringler D.H., Newcomer C.E., Academic Press, San Diego.
- KORSTANJE R., GILLISSEN G.F., DEN BIEMAN M.G., VERSTEEG S.A., VAN OOST B., FOX R.R., VAN LITH H.A., VAN ZUTPHEN L.F. 2001. Mapping of rabbit chromosome 1 markers generated from a microsatellite-enriched chromosome-specific library. *Anim. Genet.*, 32(5), 308-12.
- KORSTANJE R., GILLISSEN G.F., VERSTEEG S.A., VAN OOST B.A., BOSMA A.A., ROGEL-GAILLARD C., VAN ZUTPHEN L.F., VAN LITH H.A. 2003. Mapping of rabbit microsatellite markers using chromosome-specific libraries. *J Hered.*, 94(2), 161-9.
- LE ROY P., ELSÉN J.M. 2000. Principes de l'utilisation des marqueurs génétiques pour la détection des gènes influençant les caractères quantitatifs, *INRA Prod. Anim.*, numéro hors série "Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales", 211-215.
- MERCHAN M., PEIRO R., ESTELLE J., SASTRE Y., SANTACREU M.A., FOLCH J.M., 2005. Candidate gene analysis in two lines of rabbits divergently selected for uterine capacity.
- MULSANT P., DE ROCHAMBEAU H., THEBAULT R.G. 2004. A note on the linkage between the angora and fgf5 genes in rabbits. *World Rabbit Sci.*, 12, 1-6.
- QUENEY G., FERRAND N., WEISS S., MOUGEL F., MONNEROT M. 2001. Stationary distributions of microsatellite loci between divergent population groups of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Mol Biol Evol.*, 18(12), 2169-2178.
- SCHUELKE M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.*, 18(2), 233-4.