

Cartographie fine d'un QTL intervenant sur la fertilité femelle chez les bovins laitiers

M. GAUTIER (1), S. FRITZ (2), C. GROHS (1), D. BOICHARD (3), A. EGGEN (1)

(1) INRA - Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Domaine de Vilvert 78352 Jouy en Josas

(2) UNCEIA - Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale, 149 rue de Bercy 75595 Paris Cedex 12

(3) INRA - Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA Domaine de Vilvert 78352 Jouy en Josas

RESUME- Le programme français de détection de QTL dans les races laitières Holstein, Normande et Montbéliarde a conduit notamment à l'identification d'un QTL associé à la fertilité femelle post partum en extrémité télomérique du chromosome 7 bovin (BTA07). Pour confirmer et affiner sa localisation, de nouveaux marqueurs et de nouvelles familles issues du programme de Sélection Assisté par Marqueurs débuté en 2000, ont été génotypés (environ 20000 typages additionnels). Les résultats de cartographie ont ensuite été intégrés à une carte comparée de haute résolution du BTA07 nouvellement développée, aboutissant à l'identification d'une région homéologue d'environ 7,5 Mb portée par le chromosome humain HSA05.

Fine mapping of a QTL affecting female fertility in dairy cattle

M. GAUTIER (1), S. FRITZ (2), C. GROHS (1), D. BOICHARD (3), A. EGGEN (1)

(1) INRA - Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Domaine de Vilvert 78352 Jouy en Josas

SUMMARY- A QTL detection project on the French Holstein, Normande, and Montbéliarde dairy cattle breeds has already identified at the telomeric end of chromosome 7 a significant QTL affecting female post partum fertility. In this study, we present the mapping strategy used to refine the QTL primo-location interval with the typing of several new markers in the same population and on additional individuals from the French Marker Assisted Selection program initiated in 2000 (resulting in about 20000 new genotypes). QTL mapping results were integrated to a newly built high resolution BTA07 map leading to the definition of a 7.5 Mb related homeologous candidate region on the human chromosome HSA5.

INTRODUCTION

La stratégie d'amélioration de la rentabilité de la production bovine laitière paraît davantage liée à une action sur la réduction des coûts de production que sur l'augmentation de la quantité produite (celle-ci étant contingente). Les différents acteurs de la filière ont donc tendance à accorder davantage d'attention aux caractères dits fonctionnels (par exemple résistance aux maladies, longévité ou fertilité). Bien que très variables génétiquement, ils sont peu héréditaires et généralement difficilement mesurables. Ces caractéristiques compliquent l'application des méthodologies classiques de sélection sur indice. Parallèlement ils présentent des corrélations génétiques négatives avec les caractères de production et ont de ce fait connu une dégradation génétique progressive. La compréhension du déterminisme génétique impliqué dans leur variabilité semble donc une alternative de choix pour assister les schémas d'amélioration génétique par l'ajout de données moléculaires (Sélection Assistée par Marqueurs ou SAM).

Un programme de grande envergure associant l'INRA et la profession représentée par l'UNCEIA a ainsi abouti à la primo-localisation de nombreux QTL (régions du génome intervenant dans la variabilité de caractères quantitatifs) pour différents caractères intéressants, dans la majorité des cas, la production laitière (Boichard *et al.*, 2003). En particulier, un QTL associé à la fertilité femelle *post-partum* et expliquant 16% de la variance génétique totale de ce caractère a été décrit en position télomérique du chromosome 7 bovin (BTA07). Ce résultat semble par ailleurs en accord avec la mise en évidence d'un QTL associé aux taux de jumeauté dans une population bovine norvégienne (Lien *et al.*, 2000).

Nous présentons dans ce qui suit l'approche retenue pour la confirmation et la restriction de l'intervalle de localisation de ce QTL par le génotypage de nouveaux marqueurs sur les individus du programme initial ainsi que par l'ajout au dispositif de nouveaux individus issus du programme de Sélection Assistée par Marqueurs initié avec les mêmes partenaires en début d'année 2000 (Boichard *et al.*, 2002). Conjointement, de nouveaux outils de cartographie comparée ont été développés de manière à caractériser la distribution des régions génomiques conservées entre le chromosome bovin BTA07 et le génome humain (Gautier *et al.*, sous presse) et valoriser ainsi l'ensemble des informations disponibles dans cette dernière espèce dont le séquençage est achevé. Il en a résulté une meilleure caractérisation de la région chromosomique contenant le QTL d'intérêt qui couvre environ 5 Mb (Mégapaire de bases). Un gène candidat a également pu être identifié et son statut est en cours d'évaluation.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. INDIVIDUS

Dans cette étude 2366 taureaux d'IA ont été utilisés, constituant un dispositif de détection dit "petites filles". Ils se distribuent en 29 familles de demi-frères par leur père : 18 en race Holstein, 6 en Montbéliarde et 5 en Normande. 18 de ces familles proviennent du programme QTL initial (Boichard *et al.*, 2003). Elles comprennent de 59 à 224 individus chacune (soit 1554 individus au total) tous nés entre 1988 et 1992. Les 15 autres familles, de taille plus réduite (de 21 à

100 individus soit 818 individus au total) sont issues du programme SAM français (Boichard *et al.*, 2002).

1.2. PHENOTYPES

Les performances des taureaux correspondent aux résultats de l'évaluation sur descendance réalisée sur la base des données de fertilité post-partum d'en moyenne 85 filles recueillies en routine pour les besoins de la sélection sur indice.

1.3. GENOTYPAGES

Parmi les 18 pères du programme initial, les résultats de primolocalisation effectuée sur la base des génotypes sur 5 marqueurs du BTA07 ont permis d'identifier 3 pères hétérozygotes putatifs (race Holstein). De même, sur la base des génotypages pratiqués sur 3 des 5 marqueurs précédents dans le cadre du programme SAM, 4 pères sur 19 ont été déclarés hétérozygotes (race Holstein). Des génotypages additionnels (environ 20000) ont été réalisés sur 22 nouveaux marqueurs de ce chromosome d'intérêt sur l'ensemble des fils des pères hétérozygotes putatifs, ainsi que sur une vingtaine de descendants des pères homozygotes du programme QTL initial, de manière à pouvoir reconstruire leurs haplotypes. La technique utilisée reposait sur une amplification par PCR en fluorescence des marqueurs regroupés en "multiplexes". Les produits sont ensuite injectés sur un séquenceur à 96 capillaires (MegaBace, Molecular Dynamics) puis les données analysées avec le logiciel Genetic Profiler v1.0 (Molecular Dynamics).

1.4. METHODOLOGIE D'ANALYSE

Les nouveaux génotypes ont été analysés conjointement avec les données déjà disponibles (soit un total d'environ 60000 génotypes) par deux types d'approches statistiques.

La première correspond à une analyse de liaison classique reposant sur une régression intra-père des performances dégressées sur la probabilité que le fils ait reçu l'un ou l'autre allèle paternel en la position testée (Boichard *et al.*, 2003). Les seuils de significativité ont été calculés par la méthode empirique de rééchantillonnage (Churchill et Doerge, 1994) et un intervalle de localisation à 95% a été construit par la méthode du "lod drop-off". Un deuxième type d'analyse populationnelle de "cartographie par substitution" (Thaller et Hoeschele, 2000) a été appliqué en utilisant les résultats de l'analyse de liaison (statut des pères au QTL déterminé par un test T) et les haplotypes paternels reconstruits. Certains pères étant liés entre eux, il a en effet été possible de suivre la transmission des haplotypes au niveau de la région d'intérêt et de le relier au statut du père au QTL.

2. RESULTATS

2.1. RESTRICTION DE L'INTERVALLE DE PRIMO-LOCALISATION DU QTL

2.1.1. Résultats de l'analyse de liaison

La présence du QTL a été confirmée au seuil de significativité de 5% calculé sur le chromosome et en race Holstein. Ce QTL ne ségrège a priori pas dans les deux autres races.

La forme de la courbe a été affinée, tandis que la position du pic n'a pas variée par rapport aux résultats de primolocalisation. De plus l'intervalle de localisation a été grandement réduit (figure 1). Le statut hétérozygote de

quatre des sept pères initiaux a été confirmé. Les trois pères non confirmés sont originaires du programme SAM (ces derniers pères ayant été choisis sur la base de données préliminaires).

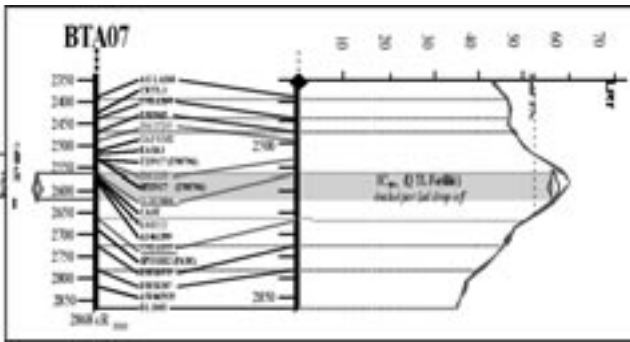


Figure 1 : Courbes de LRT (Likelihood Ratio Test, en français : test de rapport de vraisemblance) pour le QTL de fertilité à l'issue des analyses des nouvelles données de génotypage et au niveau du pic de localisation.

2.1.2. Analyse populationnelle

L'étude des haplotypes a permis de tirer des conclusions intéressantes. En effet, un des pères (numéro 15019) est hétérozygote au QTL tandis que 5 de ces fils, et 2 de ces petit-fils sont également inclus dans le programme en tant que père ce qui permet d'évaluer leur statut au QTL (deux sont ainsi hétérozygotes). Grâce à ces caractéristiques généalogiques, l'application d'une approche de cartographie par substitution a permis de réduire l'intervalle de confiance de la localisation du QTL à un intervalle "critique" borné par les marqueurs ILSTS006 et INRA053 (figure 2).

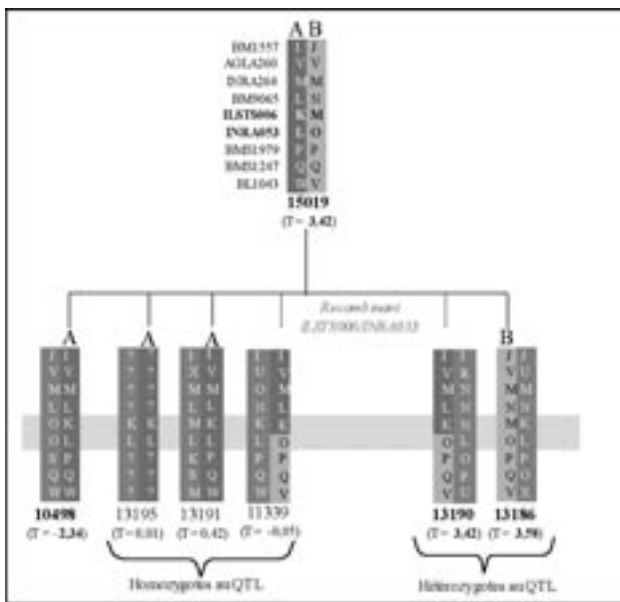


Figure 2 : transmission des deux haplotypes, notés A et B du père hétérozygote 15019 vers certains de ses descendants (5 fils et 1 petit-fils) inclus dans le protocole de détection comme père de famille (voir texte).

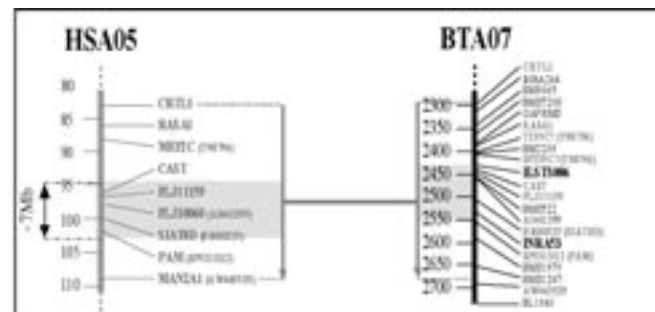
Les haplotypes hérités par les mères sont colorés en gris. Les pères 13339 et 13190 ont hérités du père 15019 le même haplotype recombinant mais possèdent un statut au QTL

différent (13339 est homozygote tandis que 13190 est hétérozygote). Le QTL peut donc être cartographié dans l'intervalle limité par les deux marqueurs encadrant la zone de recombinaison. Ce schéma constitue une illustration de l'approche de cartographie par substitution.

La transmission des deux haplotypes portés par le père 15019 (notés A et B sur la figure 2) à été déduite de l'observation des haplotypes portés par ses descendants et intégrés au programme QTL en tant que pères de familles. Deux pères (13190 et 11339) ont hérité du même haplotype recombinant entre ces deux marqueurs. Ils présentent cependant un statut au QTL différent : l'un est homozygote (11339 avec $T = -0,05$) alors que l'autre est hétérozygote (13190 avec $T = 3,42$). Parmi les quatre pères ayant hérité de l'haplotype A, seul 10498 apparaît hétérozygote au QTL ($T = -2,34$). Cet haplotype semble donc être associé à une forme sauvage de l'allèle au QTL, qui aurait été dans ce dernier cas transmis par la voie maternelle. Parmi les six haplotypes maternels seul un serait donc porteur de cet allèle sauvage qui semblerait donc relativement rare dans la population.

2.1.3. Ancrage de l'intervalle de localisation sur la carte humaine

A partir des informations de cartographie comparée (Gautier *et al.*, sous presse), l'intervalle "critique" de localisation



borné par les deux microsatellites bovins ILSTS006 et INRA053 a été ancré sur une région d'environ 5 Mb portée par le chromosome 5 humain (figure 3).

Figure 3 : ancrage de l'intervalle de localisation du QTL de fertilité (figuré en par un rectangle gris) porté par le chromosome BTA07 sur la carte humaine du chromosomes HSA05, à partir des données de cartographie comparée (Gautier *et al.*, sous presse).

Les informations disponibles chez l'homme ont permis d'identifier des gènes représentant de bons candidats fonctionnels. En particulier, l'aminopeptidase (LNPEP), dont la localisation bovine dans la position attendue vient d'être confirmée (données non publiées) intervient dans la synthèse de nombreux hormones et neuromédiateurs, importants à la fois pour la fertilité et plus généralement pour le métabolisme énergétique. Le nombre de gènes décrits à ce jour demeure cependant très réduit, même pour une région très peu dense en gènes. Il est fort probable que d'autres candidats fonctionnels puissent exister ; de nombreuses EST humaines (>100) sont, en effet, également cartographiées dans cet intervalle.

3. DISCUSSION

Si la présence du QTL a été confirmé et affiné, il apparaît encore prématuré de tirer des conclusions sur le déterminisme de ce QTL. Néanmoins, le protocole étant encore largement informatif, des typages additionnels, en cours à partir de nouveaux marqueurs développés à l'intérieur de l'intervalle de localisation, associés à l'application de nouvelles méthodes d'analyses plus fine par déséquilibre de liaison devraient aboutir rapidement à une meilleure caractérisation de la région d'intérêt et à une évaluation du gène candidat.

Par ailleurs, à ce stade de l'étude il n'est pas encore possible de déterminer le statut, améliorateur ou détériorateur, de l'allèle sauvage porté par l'haplotype A identifié ci-dessus (figure 2). Aucun marqueur contenu dans ce dernier ne présentant de déséquilibre de liaison (données non montrées), la mise en évidence d'un effet allélique est impossible à l'échelle de la population. Il faut cependant noter que, quel que soit l'effet de l'allèle sauvage, sa caractérisation fine demeure intéressante, d'autant plus qu'il semble peu fréquent. S'il s'agit d'un allèle améliorateur, une stratégie de SAM viserait à augmenter sa fréquence dans la population. S'il s'agit d'un allèle détériorateur, son

identification permettrait de le contre-sélectionner (stratégie de SAM "négative") afin d'éviter sa diffusion dans la population et de limiter ainsi la détérioration de la fertilité observée dans la population bovine laitière.

CONCLUSION

Cette étude constitue une illustration de la puissance des nouveaux outils d'investigation du génome pour la compréhension du déterminisme génétique des caractères complexes. L'application des connaissances obtenues devrait permettre le développement à court terme de nouveaux outils pour lever certaines des limites de la sélection sur indice.

Les auteurs tiennent à remercier Marie Yvonne Boscher et Marie Noëlle Rossignol (GIE LABOGENA) pour avoir mis à disposition les échantillons d'ADN des individus du protocole.

Boichard, D., et al., 2002. Proceedings of the 7th WCGALP
Boichard, D., et al., 2003. Genet. Sel. Evol., 35, 77-101
Churchill, G. A., Doerge, R.W., 1994. Genetics, 138, 963-971
Gautier, M., et al., 2003. Cytogenet. Gen. Res., sous presse
Thaller, G., Hoeschele, I., 2000. Genet. Res. 76, 87-104
Lien, S., et al., 2000. Mamm Genome, 11, 877-82