

3 - Cartographie des génomes

H. LEVÉZIEL, E.P. CRIBIU

INRA, Laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas cedex

e-mail : leveziel@biotec.jouy.inra.fr

Etat des lieux de la cartographie du génome des ruminants

Résumé. Des progrès extrêmement rapides ont été réalisés au cours des dix dernières années dans la cartographie du génome des ruminants. Aujourd'hui, des informations sont disponibles pour près de 2600 (dont 600 gènes), 1000 (350) et 600 (250) loci respectivement chez les bovins, les ovins et les caprins. Des cartes génétiques couvrant plus de 90 % du génome ont été élaborées, avec un intervalle moyen entre marqueurs contigus qui, selon les espèces, est de l'ordre de 3 à 14 cM. Cet article résume les travaux récents et leur évolution.

Dans les espèces animales d'intérêt économique et notamment chez les ruminants (bovins, ovins, caprins), l'effort de cartographie des génomes a été largement intensifié durant les dix dernières années. Des programmes importants ont été mis en place au début des années 90 (voir Gellin et Grosclaude 1991) ; leur objectif initial était la construction de nouveaux outils appelés «cartes du génome». Ni le séquençage total ni même l'établissement de cartes complètes à haute densité n'étaient alors envisagés : il s'agissait avant tout d'élaborer un réseau de gènes ou marqueurs, répartis environ tous les 20 cM, et devant servir efficacement au repérage des zones du génome contrôlant en totalité ou en partie la variabilité génétique des caractères d'intérêt économique (détection de QTL). L'idée retenue était qu'il conviendrait ensuite de dresser des cartes plus fines de ces régions, pour chercher des marqueurs génétiques proches des QTL (les encadrant et permettant une sélection assistée par marqueurs) ou pour aborder leur identification (clonage positionnel). Cet article, consacré aux ruminants, résume l'évolution des travaux récents, décrit succinctement l'état des connaissances actuelles et indique quelques perspectives.

1 / La construction des cartes

En ce qui concerne les ruminants, les efforts les plus intenses ont porté sur les bovins pour diverses raisons (enjeux économiques, nombre de pays et d'équipes concernés, connaissances disponibles). La mise en place effective des projets a bénéficié, d'une part, d'une évolution rapide des méthodes d'investigation et d'analyse du génome (PCR et microsatellites pour la carte génétique, caryotype standard et hybridation *in situ* en fluorescence pour la carte chromosomique) et, d'autre part, d'une large mobilisation internationale (voir Levéziel *et al* 1995). Le nombre de loci pour lesquels des informa-

tions de cartographie sont disponibles est passé de 301 en 1991 à 877 en 1994, année de publication des cartes génétiques de première génération (voir Eggen et Fries 1995). Depuis, les travaux ont été consacrés, soit à l'amélioration des cartes (augmentation du nombre de marqueurs (Barendse *et al* 1997, Kappes *et al* 1997), intégration des cartes (Ferretti *et al* 1997), standardisation de la nomenclature des chromosomes (Popescu *et al* 1996), cartographie de gènes, cartographie comparée (Hayes 1995) et à la création de nouveaux outils (banques de grands fragments, collection d'hybrides d'irradiation), soit à l'utilisation des cartes et à leur exploitation (recherche de QTL). Aujourd'hui, chez les bovins (tableau 1), 2594 loci cartographiés, dont 609 gènes, sont répertoriés dans la base BOVMAP (http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/live_stock.pl). Malgré l'absence d'une carte unique, de nombreux marqueurs permettent leur connexion et il peut être retenu que l'intervalle moyen entre marqueurs contigus est de l'ordre de 2,5 à 8,5 cM selon les cartes USDA (Kappes *et al* 1997) ou internationale (Barendse *et al* 1997), qui couvrent respectivement 2990 cM ou 3532 cM.

Comme espéré, la très forte homologie génétique et chromosomique entre les trois espèces de ruminants d'élevage a permis la transposition rapide aux autres espèces d'un certain nombre des outils ou résultats acquis chez les bovins. Au moins 40 % des microsatellites bovins peuvent être utilisés chez les ovins ou les caprins. La situation chez les ovins a également évolué assez rapidement : 107 loci étaient cartographiés en 1993 (voir Echard *et al* 1994), et des données sur 971 loci dont 348 gènes (tableau 1) sont aujourd'hui répertoriées dans la base SheepBase (<http://zaphod1.agresearch.cri.nz:8002/cgi-bin/arkdb/browsers/browser.sh>). Une première carte génétique ovine a été publiée en 1995 (Crawford *et al* 1995) et une carte plus complète, de seconde génération, comportant 519 marqueurs

couvrant 2866 cM avec un intervalle moyen de 6,4 cM, est maintenant disponible (de Gortari *et al* 1998). Le développement des connaissances concernant les caprins a été plus lent, et la quasi totalité des résultats ont été acquis en France dans le cadre d'un travail sur la localisation du syndrome d'intersexualité (Vaiman *et al* 1996a) qui a permis la construction d'une carte complète (Vaiman *et al* 1996b) couvrant aujourd'hui plus de 2700 cM avec un intervalle moyen de 14,5 cM (tableau 1). La base GOATMAP (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap>

/livestock.pl) contient des informations sur 563 loci dont 248 gènes. Il est important de souligner que ces travaux dans l'espèce caprine ont mis à profit les progrès récents concernant la possibilité de construction de banques génomiques de grands fragments en chromosomes artificiels bactériens (BAC) : l'approche originale utilisée a consisté en la production ciblée de marqueurs proches de gènes, conduisant alors à un enrichissement simultané des cartes intégrées et comparées (Schibler *et al* 1998a).

Tableau 1. Cartographie des génomes des ruminants : principaux résultats.

	Bovins	Ovins	Caprins
Nombre de chromosomes	60	54	60
Base de données - nom - site	BOVMAP INRA	SheepBase AgResearch	GOATMAP INRA
Loci cartographiés - nombre total - nombre de gènes - nombre de références biblio	2594 609 682	971 348 470	563 248 477
Familles de référence - nombre - type - taille - effectif total	21 F1, F2 9 à 36 330	9 F2 7 à 18 127	12 F1 9 à 72 574
Génome marqué - longueur totale (cM) - intervalle moyen (cM) - trous (>30cM)	2990 ou 3532 ⁽¹⁾ 2,5 ou 8,5 ⁽¹⁾ 0	2866 6,4 3	2700 14,5 3
Nombre de collections d'hybrides somatiques	3	2	-
Chromosomes triés	Oui	Oui	-
Banques de grands fragments ⁽²⁾ YAC BAC	4 (19) 3 (9)	1 (3) 1 (3,4)	- 1 (3)
Nombre de collections d'hybrides d'irradiation	3	-	-

⁽¹⁾ Les chiffres indiqués se rapportent respectivement à la carte USDA (Kappes *et al* 1997) et à la carte internationale (Barendse *et al* 1997).

⁽²⁾ pour chaque espèce et chaque type de banque (YAC ou BAC), sont indiqués le nombre de banques existantes et, entre parenthèses, le nombre global d'équivalents génomes.

2 / La cartographie comparée

De nombreux efforts ont été réalisés pour comparer de plus en plus finement les cartes des ruminants avec celles des espèces les plus documentées, notamment la carte humaine considérée comme carte de référence. En effet, à partir du moment où une région d'intérêt devra être étudiée en détail, il sera important de pouvoir connaître la région homologue sur la carte humaine et ainsi d'identifier

de possibles gènes candidats positionnels. Seule la cartographie des mêmes gènes dans plusieurs espèces permet d'enrichir la carte comparée (O'Brien *et al* 1993) et des efforts constants ont été réalisés par les équipes dans cette optique. La possibilité de trier des chromosomes (Schmitz *et al* 1995, Burkin *et al* 1997), si elle a permis de produire des marqueurs de manière ciblée (Vaiman *et al* 1997a et 1997b), a surtout fourni une vision globale de la situation, par la réalisation d'expériences de

«coloriage hétérologue», en particulier à l'aide de sondes spécifiques de chromosomes humains (Hayes 1995, Solinas-Toldo *et al* 1995, Chowdhary *et al* 1996, Schmitz *et al* 1998, Iannuzzi *et al* 1999). Plus récemment, plusieurs approches systématiques visant à la localisation rapide d'un grand nombre de gènes ont été proposées (voir par exemple pour les CATS, EST ou TOAST respectivement : Lyons *et al* 1997, Ma *et al* 1998, Jiang *et al* 1998), mais avec un succès limité. Finalement, c'est le choix d'amorces sur des séquences exoniques consensus, allié à la disponibilité de banques de grands fragments, qui a pu permettre à Schibler *et al* (1998a) de formuler la synthèse la plus complète sur la comparaison du génome des ruminants avec ceux de l'Homme et de la souris : la localisation de 255 gènes a montré que l'évolution du génome des mammifères est basée sur la redistribution par des réarrangements inter- ou intra-chromosomiques d'un peu plus d'une centaine de segments chromosomiques.

3 / Les nouveaux outils

Dans ce domaine, les travaux ont principalement été focalisés sur la construction d'outils permettant d'améliorer le pouvoir d'investigation pour la cartographie physique. Plusieurs banques de grands fragments en chromosomes artificiels de levure (YAC) ont été construites chez les bovins (Libert *et al* 1993, Smith *et al* 1996, Takeda *et al* 1998, Hills *et al* 1999) et les ovins (Broom et Hill 1994). Compte tenu de leurs avantages (moindre chimérisme, réalisation et entretien plus aisés), ce sont des banques de BAC qui ont été plus récemment élaborées pour les bovins (Cai *et al* 1995, Zhu *et al* 1999, Eggen *et al*, en préparation), les caprins (Schibler *et al* 1998b) et les ovins (Vaiman *et al* 1999). Globalement, ces diverses banques représentent 28, 6,4 et 3 équivalents génomes respectivement pour les espèces bovine, ovine et caprine (tableau 1). Elles représentent des outils essentiels pour la construction de contigs des régions d'intérêt et la recherche de gènes candidats positionnels. Leur utilisation bénéficie également, chez les bovins, de l'existence de collections d'hybrides d'irradiation qui aident à la construction de cartes physiques à haute résolution. Une première collection est maintenant caractérisée pour plusieurs chromosomes (Womack *et al* 1997, Band *et al* 1998) ; deux autres, obtenues avec des doses d'irradiations plus importantes permettant d'atteindre une meilleure résolution, sont en cours d'évaluation.

4 / L'utilisation des cartes

Cet aspect n'est que sommairement évoqué ici. L'évolution des méthodes d'analyse du génome (notamment pour l'étude des polymorphismes), la disponibilité d'un grand nombre de marqueurs génétiques (en particulier de type microsatellites) et l'existence des cartes ont permis de mettre à la disposition des éleveurs des applications dans de nombreux domaines : génotypages pour des gènes d'intérêt, identification des animaux, contrôle de filiation, traçabilité individuelle ou raciale, caractérisation des populations, localisation de gènes majeurs ou de gènes contrôlant soit des caractères à déter-

minisme monogénique soit des maladies, détection de QTL (pour les bovins, voir Levéziel 1998 ou Boichard 1998). Plusieurs remarques méritent d'être faites. Tout d'abord, il faut souligner que l'utilisation des cartes, notamment pour la recherche de QTL, a nécessité la mise en place d'importantes capacités de typage, basées sur une automatisation et une informatisation performantes. Par ailleurs, au moins pour les bovins, cette recherche de QTL a le plus souvent concerné la production laitière, ce qui s'explique par la plus grande difficulté de disposer de structures familiales adéquates dans le cas de la production de viande et des races allaitantes. Enfin, il faut insister sur le fait que les travaux sur le caractère culard des bovins (mh) constituent aujourd'hui le seul exemple d'identification du gène responsable (gène de la myostatine) d'un caractère quantitatif chez les ruminants (Grobet *et al* 1997).

Conclusion et perspectives

En moins de dix ans, des progrès extrêmement rapides ont été réalisés et les outils d'investigation dont disposent les généticiens pour localiser et identifier les gènes contrôlant les caractères d'intérêt économique n'ont jamais atteint une telle puissance. Les cartes génétiques existantes, qui d'ailleurs sont le plus souvent des cartes du génome mâle, sont certes perfectibles, mais leur densité actuelle permet, avec de bonnes chances de réussite, d'entreprendre la localisation de gènes expliquant une part de la variabilité génétique des caractères de production encore en ségrégation dans les populations. A cet égard, les objectifs affichés au début des années 90 (résolution de 20 cM) sont largement dépassés ; néanmoins, il ne faut pas oublier que la mise à profit de tout ce potentiel ne pourra se faire sans disposer de populations ou de familles de structure et taille convenables, sur lesquelles des performances complètes et détaillées auront été mesurées : il s'agit là sans doute du facteur le plus limitant. Au-delà, il est tout aussi évident que ces cartes génétiques, malgré leurs qualités, ne sont pas suffisantes pour construire des cartes à très haute résolution et pour, en définitive, identifier les gènes recherchés. C'est pourquoi les travaux se sont orientés dans la période récente vers l'utilisation de méthodes complémentaires analysant par exemple le déséquilibre de liaison (Riquet *et al* 1999) ou reposant sur le développement d'outils de cartographie physique et la construction de contigs.

En tout état de cause, même dans les cas où une région comportant le gène d'intérêt est repérée, son identification précise ne sera en général pas chose facile et diverses sources de complexité seront rencontrées, comme la variabilité des taux de recombinaison (Simianer *et al* 1997), ou l'existence de mécanismes d'hérédité non-mendéliens (Cockett *et al* 1996) comme les phénomènes d'empreintes (McLaren et Montgomery 1999). Identifier le plus rapidement possible les gènes candidats positionnels demeure encore une gageure, et repérer parmi ceux-ci le meilleur candidat fonctionnel constitue un nouveau défi que les équipes doivent s'approprier à aborder. A ce propos, il semble bien que les années à venir seront consacrées à l'étude de régions d'intérêt, qu'elles soient au départ repérées par une approche génétique du type «détection de QTL» ou par une approche physiologique du type «gène candidat». Dans tous les cas il faudra, par l'étude de

populations ou de familles d'une part, par la compréhension de la biologie et du déterminisme génétique du caractère d'autre part, identifier avec pertinence le gène responsable. En cela, les deux approches ne seront plus complémentaires mais devront se fondre en une démarche unique faisant

appel à de nombreuses compétences. Reste qu'un des moyens d'accélérer notre quête des gènes d'intérêt serait sans doute de disposer au plus vite d'une banque de grands fragments ordonnée, au moins pour une des trois espèces, sous forme de contigs couvrant l'ensemble du génome.

Références

- Band M., Larson J.H., Womack J.E., Lewin H.A., 1998. A radiation hybrid map of BTA23: identification of a chromosomal rearrangement leading to separation of the cattle MHC class II subregions. *Mammalian Genome*, 53, 269-275.
- Barendse W., Vaiman D., Kemp S.J., Sugimoto Y., Armitage S.M. *et al* , 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome*, 8, 21-28.
- Boichard D., 1998. QTL detection with genetic markers in dairy cattle: an overview. 49th Annual Meeting of the EAAP, Warsaw, Poland, 24-27 August 1998.
- Broom M.F., Hill D.F., 1994. Construction of a large-insert yeast artificial chromosome library from sheep DNA. *Mammalian Genome*, 5, 817-819.
- Burkin D.J., O'Brien P.C.M., Broad T.E., Hill D.F., Jones C.A. *et al* , 1997. Isolation of chromosome-specific paints from high-resolution flow karyotypes of the sheep (*Ovis aries*). *Chromosome Research*, 5, 102-109.
- Cai, L., Taylor, J.F., Wing, R.A., Gallagher, D.S., Woo, S.S. *et al* , 1995. Construction and characterization of a bovine Bacterial Artificial Chromosome library. *Genomics*, 29, 413-425.
- Chowdhary B.P., Fröncke L., Gustavsson I., Scherthan H., 1996. Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-fish and gene mapping-based chromosomal homologues. *Mammalian Genome*, 7, 297-302.
- Cockett N.E., Jackson S.P., Shay T.L., Farnir F., Berghmans S. *et al* , 1996. Polar overdominance at the ovine *callipyge* locus. *Science*, 273, 236-238.
- Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A.J., Pierson C.A., Montgomery G.W. *et al* , 1995. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, 140, 703-724.
- De Gortari M.J., Freking B.A., Cuthbertson R.P., Kappes S.M., Keele J.W. *et al* , 1998. A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mammalian Genome*, 9, 204-209.
- Echard G., Broad T.E., Hill D., Pearce P., 1994. Present status of the ovine gene map (*Ovis aries*) ; comparison with the bovine map (*Bos taurus*). *Mammalian Genome*, 5, 324-332.
- Eggen A., Fries R., 1995. An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Animal Genetics*, 26, 215-236.
- Ferretti L., Urquhart B.G.D., Eggen A., Olsaker I., Harlizius B. *et al* , 1997. Cosmid derived markers anchoring the bovine genetic to the physical map. *Mammalian Genome*, 8, 29-36.
- Gellin J., Grosclaude F., 1991. Analyse du génome des espèces d'élevage : projet d'établissement de la carte génétique du porc et des bovins. *INRA Productions Animales*, 4, 97-105.
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B. *et al* , 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71-74.
- Hayes H., 1995. Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71, 168-174.
- Hills D., Tracey S., Masabanda J., Fries R., Schalkwyk L.C. *et al* , 1999. A bovine YAC library containing four- to five fold genome equivalents. *Mammalian Genome*, 10, 837-838.
- Iannuzzi L., Di Meo G.P., Perucatti A., Incarnato D., 1999. Comparison of the human with the sheep genomes by use of human chromosome-specific painting probes. *Mammalian Genome*, 10, 719-723.
- Jiang Z., Priat C., Galibert F., 1998. Traced orthologous amplified sequence tags (TOASTs) and mammalian comparative maps. *Mammalian Genome*, 9, 577-587.
- Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S. *et al* , 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7, 235-249.
- Levéziel H., 1998. Mapping and diagnosis in use in bovines. 6e séminaire Agrogène, Paris, 26-27 février 1998.
- Levéziel H., Vaiman D., Eggen A., Cribiu E., Guérin G., Hayes H., 1995. Méthodes de construction et état d'avancement des cartes génétiques des ruminants. *Rencontres Recherches Ruminants*, 2, 155-162.
- Libert F., Lefort A., Okimoto R., Womack J., Georges M., 1993. Construction of a bovine genomic library of large Yeast Artificial Chromosome clones. *Genomics*, 18, 270-276.
- Lyons L.A., Laughlin T.F., Copeland N.G., Jenkins N.A., Womack J., O'Brien S.J., 1997. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genetics*, 15, 47-56.
- Ma R.Z., van Eijk M.J.T., Beever J.E., Guérin G., Mummery C.L., Lewin H.A., 1998. Comparative analysis of 82 expressed sequence tags from a cattle ovary cDNA library. *Mammalian Genome*, 9, 545-549.
- McLaren R.J., Montgomery G.W., 1999. Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. *Mammalian Genome*, 10, 588-591.
- O'Brien S.J., Womack J., Lyons L.A., Moore K.J., Jenkins N.A., Copeland N.G., 1993. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genetics*, 3, 103-112.
- Popescu C.P., Long S., Riggs P., Womack J., Schmutz S., Fries R., Gallagher D.S., 1996. Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 74, 259-261.
- Riquet J., Coppieters W., Cambisano N., Arranz J.J., Berzi P. *et al* , 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96, 9252-9257.
- Schibler L., Vaiman D., Oustry A., Giraud-Delville C., Cribiu E.P., 1998a. Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and human. *Genome Research*, 8, 901-915.
- Schibler L., Vaiman D., Oustry A., Guinec N., Dangy-Caye A.L. *et al* , 1998b. Construction and extensive characterization of a goat Bacterial Artificial Chromosome library with threefold genome coverage. *Mammalian Genome*, 9, 119-124.

- Schmitz A., Oustry A., Chaput B., Bahri-Darwich I., Yerle M., *et al*, 1995. The bovine bivariate flow karyotype and peak identification by chromosome painting with PCR-generated probes. *Mammalian Genome*, 6, 415-420.
- Schmitz A., Oustry A., Vaiman D., Chaput B., Frelat G., Cribiu E.P., 1998. Comparative karyotype of pig and cattle using whole chromosome painting probes. *Hereditas*, 128, 257-263.
- Simianer H., Szyda J., Ramon G., Lien S., 1997. Evidence for individual and between-family variability of the recombination rate in cattle. *Mammalian Genome*, 8, 830-835.
- Smith T.P.L., Alexander L.J., Sonstergard T.S., Yoo, J. Beattie C.W. *et al*, 1996. Construction and characterization of a large insert bovine YAC library with five-fold genomic coverage. *Mammalian Genome*, 7, 155-156.
- Solinas-Toldo S., Lengauer C., Fires R., 1995. Comparative genome mapping of human and cattle. *Genomics*, 27, 489-496.
- Takeda H., Yamakuchi H., Ihara N., Hara K., Watanabe T. *et al*, 1998. Construction of a bovine yeast artificial chromosome (YAC) library. *Animal Genetics*, 29, 216-219.
- Vaiman D., Koukita O., Oustry A., Elsen J.M., Manfredi E. *et al*, 1996a. Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn developments in goats. *Mammalian Genome*, 7, 133-137.
- Vaiman D., Schibler L., Bourgeois F., Oustry A., Amigues Y. *et al*, 1996b. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics*, 144, 279-305.
- Vaiman D., Pailhoux E., Schmitz A., Giraud-Delville C., Cotinot C., Cribiu E.P., 1997a. Mass production of genetic markers from a limited number of sorted chromosomes. *Mammalian Genome*, 8, 153-156.
- Vaiman D., Schibler L., Oustry A., Schmitz A., Furet J.P. *et al*, 1997b. A cytogenetically anchored genetic map of bovine chromosome 1 obtained by integrating flow-sorted derived microsatellite markers into the international bovine map. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 79, 204-207.
- Vaiman D., Billault A., Tabet-Aoul K., Schibler L., Vilette D. *et al*, 1999. Construction and characterization of a sheep BAC library of three genome equivalents. *Mammalian Genome*, 10, 585-587.
- Womack J.E., Johnson J.S., Owens E.K., Rexroad III C.E., Schläpfer J., Yang Y., 1997. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mammalian Genome*, 8, 854-856.
- Zhu B., Smith J.A., Tracey S.M., Konfortov B.A., Welzel K. *et al*, 1999. A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mammalian Genome*, 10, 706-709.

