

G. GUÉRIN

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

e-mail : Gerard.Guerin@biotec.jouy.inra.fr

3 - Cartographie des génomes

La cartographie du génome équin

Résumé. La cartographie du génome équin a pris une dimension internationale en 1995. Elle a depuis créé les outils nécessaires à sa construction : panel de marqueurs et de familles internationales, panels d'hybrides somatiques et d'hybrides irradiés, banques de petits, moyens et grands fragments, caryotype de référence, bases de données. Elle entre dans une phase de production active de résultats et doit dès à présent recueillir des familles ressource pour appliquer les acquis de la carte génomique. La question d'établir une carte à haute densité est actuellement posée.

La décision de construire une carte génomique équine a été prise par les équipes impliquées dans l'étude du polymorphisme sanguin alors essentiellement destiné à l'identification et au contrôle de filiation. Une collaboration internationale est apparue indispensable pour fédérer ces petites équipes dispersées et éveiller les consciences dans ce milieu réputé traditionnel et individualiste.

Un projet commun regroupant les initiatives des différents laboratoires s'est concrétisé lors du premier atelier international de cartographie équine tenu à l'Université du Kentucky en octobre 1995. Les objectifs de ce programme de cartographie sont de fournir un ensemble de moyens moléculaires afin d'améliorer de contribuer à l'amélioration de l'élevage par une sélection des animaux les plus sains et les plus performants. Bénéficiant des acquis des autres espèces, les divers outils méthodologiques ont été mis en place dans une courte période de temps pour atteindre les premiers objectifs de cartographie, comme l'obtention d'une carte génétique, d'une carte génomique intégrée et la mise en commun de ressources.

1 / La carte génétique

Les décisions les plus marquantes de la réunion de 1995 ont été de produire des marqueurs microsatellites et de construire un panel international de 135 familles de 30 à 40 produits de demi-germains de différentes races pour établir une carte de microsatellites. L'ensemble des typages effectués par le consortium est rassemblé dans la base de données Mapgena (Neau *et al* 2000, ce numéro) de l'INRA de Jouy-en-Josas pour une analyse de liaison sur place. De plus, trois laboratoires ont générée leurs propres ressources familiales, : deux familles de demi-germains (Jouy, France et Uppsala, Suède) et de deux

familles de germains basées sur des fœtus de 30 jours obtenus par croisement raisonné entre un étalon et deux pleines soeurs (Newmarket, Royaume-Uni). Les résultats globaux des analyses de liaison sont reportés dans le tableau 1 (Lindgren *et al* 1998, Guérin *et al* 1999, Swinburne *et al* 2000).

Tableau 1. Résultats des analyses de liaison. (Entre parenthèses : données non publiées)

Carte génétique	Internationale	Suédoise	Britannique
Nombre total de marqueurs	124 (262)	100	(334)
Nombre de microsatellites	115 (248)	92	
Nombre de gènes	9 (14)	8	
Nombre de groupes de liaison	29 (31)	25	(42)
Taille en (cM)	936	679	(1780)

2 / La carte génomique

Plusieurs approches méthodologiques complémentaires ont été utilisées afin de construire une carte génomique fiable, composée de marqueurs microsatellites et de gènes.

2.1 / La standardisation du caryotype équin

Bien que son caryotype ($2n=64$) en bandes G ait été défini à la Conférence de Reading dès 1976, l'absence d'un consensus total a conduit à définir un nouveau standard à Jouy en 1989, complété par le

système international de nomenclature publié en 1997 (Bowling *et al* 1997), et qui sert actuellement de référence. La collaboration internationale a permis récemment de clarifier certaines ambiguïtés et il a été décidé de rassembler un panel de sondes localisables par hybridation en fluorescence (FISH) sur chaque bras de chromosome afin de mieux les identifier. Ce panel sera mis à la disposition des laboratoires de cytogénétique.

2.2 / La « Zoo-FISH »

La comparaison des génomes entre les espèces pour lesquelles les cartes sont riches en gènes et celles qui en sont dépourvues, ce qui est le cas chez le cheval, permet de sélectionner des régions du génome humain pour baliser judicieusement l'ensemble du génome considéré. C'est ainsi que le travail de coloriage chromosomique hétérologue du génome équin avec des sondes spécifiques des chromosomes humains non seulement a permis d'enrichir la carte équine, mais a fourni des indications précieuses sur les relations entre les génomes des espèces (Raudsepp *et al* 1996). Un degré élevé de conservation de synténie est observé parmi les 43 segments communs. Sept chromosomes humains colorent chacun entièrement un chromosome équin unique alors que, dans la majorité des cas, les autres détectent des bras entiers de chromosomes, ce qui suggère qu'avec ce degré de précision, des remaniements limités sont observés. Seul, le chromosome 1 équin, coloré par 7 chromosomes humains différents, se distingue. Quatre chromosomes entiers équins, dont le chromosome Y, n'ont pas de correspondants humains. La microdissection de certains chromosomes ou de bras de chromosomes humains et équins, utilisés comme sondes, a ouvert la voie de la comparaison des génomes de l'homme, du cheval et de l'âne.

2.3 / La carte cytogénétique (tableau 2)

L'objectif poursuivi est d'ancre les groupes de liaison et les groupes de synténie aux chromosomes et de construire une carte de gènes afin d'utiliser la comparaison entre génomes pour développer une stratégie de gènes candidats positionnels et fonctionnels. Des banques de cosmides et de phages ont été construites et criblées avec des amores de microsatellites. Plus récemment, deux banques de BAC construites, l'une à l'INRA de Jouy-en-Josas (Godard *et al* 1998) et l'autre aux USA (College Station, Texas), ont surtout été exploitées pour localiser des gènes à partir d'amores équines ou, à défaut, d'amores consensus hétérospecifiques intra ou inter-exoniques. La carte cytogénétique sera complétée par la localisation de BAC hétérospecifiques.

2.4 / Les groupes de synténie et la localisation physique

Sur les trois panels d'hybrides somatiques cheval/souris réalisés (Williams *et al* 1993, Caetano *et al* 1999, Shiue *et al* 1999), seul celui de Davis (Shiue *et al* 1999) a été très largement exploité. Plus de 500 marqueurs sont actuellement localisés dans les 32 groupes (A.T. Bowling, communication personnelle) dont l'assignation à des chromosomes vient de se terminer. Des cassures de chromosomes dans ce

Tableau 2. Etat de la carte des gènes. (Entre parenthèses : données non publiées).

Carte cytogénétique et de synténie	FISH	Synténie	Synténie
Nombre total de marqueurs	100	340	(500)
Nombre de gènes	50	100	(100)
Nombre de microsatellites	50	180	
Nombre d'autres marqueurs		60	
Banque de BAC	INRA-Jouy France	TAMU/DK Etats-Unis	
Nombre de clones	100 000	50 000	
Taille moyenne (kb)	110	120	
Génome équivalent	4	1	
Nombre d'adresses identifiées	200		(faible)
Hybrides d'irradiation	TAMU/DK Etats-Unis	Cambridge Royaume-Uni	
Dose (rad)	5000	3000	
Taux de rétention (%)	-	30	
Caractérisation	En cours	En cours	

panel permettent en outre de l'utiliser partiellement comme un panel d'hybrides d'irradiation.

Récemment, deux panels d'hybrides irradiés ont été construits, l'un aux Etats-Unis (TAMU/DK) et l'autre en Grande-Bretagne (Cambridge). Ils sont en cours de caractérisation et leur potentiel, évalué avant la fin de l'année, permettra d'optimiser la stratégie de leur exploitation.

2.5 / Les bases de données

Deux bases de données sont disponibles sur le web, l'une développée à l'INRA de Jouy-en-Josas (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/livestock.pl>) et l'autre accessible au Roslin Institute en Ecosse (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/arkdb/browse/browser.sh?species=horse>). Ces bases, de performance équivalente, elles doivent être mises à jour simultanément par un comité international restreint.

3 / Les applications

L'approche des gènes candidats a permis d'identifier les gènes responsables de l'hyperkaliémie périodique paralysante (HYPP) et du syndrome létal du poulain blanc (OLWS), et une analyse de liaison a confirmé le rôle d'une DNA-protein kinase (DNA-PK) dans l'immunodéficience combinée (SCID) (Bailey *et al* 1997). Un test moléculaire est proposé pour chacune des deux maladies HYPP et SCID. A terme, les données de cartographie doivent ainsi permettre, ou faciliter, l'identification de gènes intervenant dans des caractères importants en élevage équin, tels que les maladies, la coloration de la robe et les performances.

Conclusion et perspectives

La forte impulsion donnée il y a plus de trois ans fait rapidement progresser la cartographie équine. La carte génétique compte environ 350 marqueurs dont 150 marqueurs publiés, les groupes de synténie comprennent 500 marqueurs et la carte cytogénétique plus d'une centaine. Les outils sont disponibles ou en cours de l'être. Mais cet effort reste insuffisant car les caractères d'intérêt pour l'élevage sont probablement polygéniques et le nombre de

marqueurs doit atteindre le millier pour assurer une bonne couverture du génome dans le cadre d'une étude familiale. La question d'une carte à haute densité est déjà posée dans la mesure où, pour certains caractères complexes, seule une approche à l'échelle de la population est envisageable avec des microsatellites et/ou des SNP. Par ailleurs, il est indispensable de mobiliser les services vétérinaires et les professionnels de l'élevage pour constituer des familles ressource ou rassembler des animaux présentant des caractères à étudier en priorité.

Références

- Bailey E., Reid R.C., Skow L.C., Mathiason K., Lear T.L., McGuire T.C., 1997. Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; synteny and FISH mapping to ECA9. *Animal Genetics*, 28, 268-273.
- Bowling A.T., Breen M., Chowdhary B.P., Hirota K., Lear T., Millon L.V., Deleon F.A.P., Raudsepp T., Stranzinger G., 1997. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. Report of the Third International Committee for the Standardization of the Domestic Horse Karyotype, Davis, CA, USA, 1996. *Chromosome Research*, 5, 433-443.
- Caetano A.R., Shiue Y.-L., Lyons L.A., O'Brien J., Laughlin T.F., Bowling A.T., Murray J.D., (1999). A comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). *Genome Research*, 9, 1239-1249.
- Godard S., Schibler L., Oustry A., Cribiu E.P., Guérin G., 1998. Construction of a horse BAC library and cytogenetical assignment of 20 type I and type II markers. *Mammalian Genome*, 9, 633-637.
- Guérin G., Bailey E., Bernoco D., Anderson I., Antczak D.F., Bell K., Binns M.M., Bowling A.T., Brandon R., Cholewinski G., Cothran E.G., Ellegren H., Förster M., Godard S., Horin P., Ketchum M., Lindgren G., McPartlan H., Mériaux J.-C., Mickelson J.R., Million L.V., Murray J., Neau A., Roed K., Sandberg K., Shiue Y.-L., Skow L.C., Stott M., Swinburne J., Valberg S.J., Van Haeringen H., Van Haeringen W.A., Ziegler J., 1999. Report of the international Equine Gene Mapping Workshop : Male Linkage Map. *Animal Genetics*, 30, 341-354.
- Lindgren G., Sandberg K., Persson H., Marklund S., Breen M., Sandgren B., Carlsten J., Ellegren H., 1998. A primary male autosomal linkage map of the horse genome. *Genome Research*, 8, 951-966.
- Neau A., Chevalet C., Bibé B., 2000. La base de données Mapgena. INRA Productions Animales, numéro hors série «Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales», 197-201.
- Raudsepp T., Fronicke L., Scherthan H., Gustavsson I., Chowdhary B.P., 1996. Zoo-FISH delineates conserved chromosomal segments in horse and man. *Chromosome Research*, 4, 218-225.
- Shiue Y.L., Bickel L.A., Caetano A.R., Millon L.V., Clark R.S., Eggleston M.L., Michelmore R., Bailey E., Guérin G., Godard S., Mickelson J.R., Valberg S.J., Murray J.D., Bowling A.T., 1999. A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Animal Genetics*, 30, 1-9.
- Swinburne J., Gerstenberg C., Breen M., Aldridge V., Lockhart L., Marti E., Antczak D., Eggleston-Stott M., Bailey E., Mickelson J., Roed K., Lindgren G., von Haeringen W., Guérin G., Bjarnason J., Allen T., Binns M., 2000. First comprehensive low-density horse linkage map based on two 3-generation, full-sibling, cross-bred horse reference families. *Genomics*, 66, 123-134.
- Williams H., Richards C.M., Konfortov B.A., Miller J.R., Tucker E.M., 1993. Synteny mapping in the horse using horse-mouse heterohybridomas. *Animal Genetics*, 24, 257-260.

