

Licence III « Biologie Cellulaire et Physiologie »
2004-2005

Travail sur les causes génétiques du caractère “queue courte” chez quelques races canines



SEGUIN Samuel

Encadrement :
Dr. Catherine ANDRÉ



Stage réalisé à l'UMR 6061,
Génétique et Développement,
CNRS, Faculté de Médecine
Avenue Pr. Léon Bernard
35043 RENNES Cédex

Travail sur les causes génétiques du caractère “queue courte” chez quelques races canines

Remerciements

Je tiens à remercier le Docteur Catherine André, ma maître de stage, pour sa disponibilité et pour m’avoir permis d’intégrer l’équipe « génétique canine » au sein de l’UMR 6061 du CNRS de Rennes. Je remercie le Docteur Benoît Hédan, vétérinaire préparant une thèse en génétique et Thierry Vilboux, doctorant en génétique, de m’avoir initié à leurs travaux de recherche. Ainsi, à mon échelle, j’ai pu entreprendre des travaux préliminaires s’inscrivant dans leur projet de thèse. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à l’ensemble de l’équipe du laboratoire qui a rendu ce stage très agréable et formateur.

Enfin, je voudrais remercier les éleveurs qui ont permis de recenser un grand nombre d’informations et de récupérer les précieux prélèvements indispensables à cette étude: Ms. Michel et Mickael Comte, éleveurs de Braque du Bourbonnais (photos des chiens en couverture), ainsi que M. Christian Dagorne, éleveur d’Epagneul breton. Enfin, je tiens à remercier les différents éleveurs de Bergers australiens qui ont participé à cette étude.

Remerciements.....	3
Glossaire.....	5
Abréviations.....	6
I) Introduction.....	7-10
-Pourquoi s'intéresser au chien?	
-Comment rechercher les causes génétiques de maladies héréditaires grâce au modèle canin?	
II) Matériel et méthodes.....	10-11
II.1) Prélèvements, Bases de données et Pedigrees.....	10
II.2) Extraction d'ADN.....	10
II.3) Amplification « tout génome » (technique GénomiPhi®).....	10
II.4) Séquençage.....	11
III) Résultats et Analyse des causes génétiques donnant le phénotype « queue courte » pour quelques races de chien.....	11-12
IV) Discussion.....	13
-Croisements possibles et descendance attendues	
V) Conclusion.....	15
Bibliographie.....	16

Glossaire

Agénésie sacrale : malformation du rachis postérieur.

Allèles : différentes versions d’une séquence d’ADN (gène ou marqueur) dans la population.
Un individu porte un allèle paternel et un allèle maternel pour un même gène.

Anoure : sans queue (pas de vertèbres sacrées).

Autosomique : lié aux chromosomes non impliqués dans le déterminisme sexuel (autosomes).

« BLAT » : logiciel d’alignement de séquences nucléotidiques.

Brachyoure : queue de petite taille ne présentant que quelques vertèbres.

Gonosomique : lié aux chromosomes sexuels X ou Y.

Haplotype : combinaison des allèles de différents marqueurs sur une même région chromosomique.

Locus : localisation d’une séquence d’ADN sur un chromosome.

Marqueur : séquence nucléotidique pouvant être amplifiée par amplification génique (PCR).

Machyoure : queue de taille normale, dite : ”queue longue”.

Pedigree : document reportant les liens familiaux d’un chien ; par extension arbre généalogique de l’ensemble des animaux d’une même famille.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BET : Bromure d'ÉThidium

C : Cytosine

CFA : chromosome de « Canis FAmiliaris »

dNTP : DéoxyNucléotide Tri Phosphate

ddNTP : DiDéoxyNucléotide Tri Phosphate

DO : Densité Optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétate

FdNTP : Déoxynucléotide Tri Phosphate Fluorescent

G : Guanine

Ile : acide aminé Isoleucine

Kb : KiloBase

LOF : Livre des Origines Françaises

HSA : Chromosome de « Homo SApiens »

Mb : MégaBase

Met : acide aminé Méthionine

pb : Paire de Bases

PCR : « Polymerase Chain Reaction », Réaction d'amplification génique

SNP : « Single Nucleotide Polymorphism », polymorphisme sur un nucléotide

TBE : Tris Borate EDTA (tampon)

TE : Tris EDTA(tampon)

Tm : « Melting Temperature », Température de fusion

UCM : Unité Centi Morgan

U et L : amorces « Upper » 5' → 3' ; et « Lower » 3' → 5'

UV : rayons UltraViolets

I) Introduction

Pourquoi s'intéresser au chien ?

L'apparition du chien en tant qu'espèce différente du loup remonte à -14.000 ans selon des études archéologiques et paléontologiques réalisées lors de fouilles du mésolithique (Clutton-Brock, 1995). Des analyses de l'ADN mitochondrial de loups et de chiens montrent que toutes les races de chiens actuelles (« *Canis familiaris* ») descendraient d'une vingtaine de populations de loups gris (« *Canis lupus* ») à travers le monde (Leonard et al., 2002).

Aujourd'hui plus de 350 races proviennent d'une sélection génétique importante réalisée surtout depuis le XIX^{ème} siècle. Ces sélections ont eu pour but de favoriser la conservation de certains caractères phénotypiques qu'ils soient dirigés pour une fonction comportementale (aptitude à la chasse, garde des troupeaux...) ou bien dirigés vers une caractéristique physique (résistance au froid, pattes palmées, petite taille...). Ainsi, ont pu être « construites », des races à fin « utilitaires » et d'autres dites « d'agrément ». Les pratiques d'élevage étant le croisement dirigé d'individus ayant les mêmes caractéristiques phénotypiques, consistent d'unions consanguines successives, ainsi que des sélections sur des critères spécifiques. Il existe donc une variation importante du point de vue comportemental ou phénotypique entre les différentes races mais une homogénéité forte au sein de chacune. Ces pratiques ont non seulement permis de sélectionner les caractéristiques recherchées mais aussi des affections génétiques qui peuvent donc avoir une forte prévalence au sein d'une race de chien. De plus, certains chiens présentant des caractéristiques « idéales » sont utilisés à maintes reprises pour la reproduction (notion « d'étalon populaire ») ; ceci a aussi pour conséquence une homogénéité génétique. Lorsqu'un allèle morbide est présent chez un étalon populaire suite à une mutation, celle-ci est distribuée à la descendance, on parle alors d'« effet fondateur » à cause de la fixation dans la race de cet allèle délétère. Ainsi, les différentes races de chien découlant de ces sélections (parfois abusives) constituent autant de populations génétiquement isolées, chacune caractérisée par un pool d'allèles spécifiques. Ces isolats génétiques que constitue chaque race canine peuvent être comparés à des populations humaines isolées géographiquement ou socialement, où il n'existe qu'un faible apport allélique extérieur ; comme les islandais et d'autres populations parfois mises à contribution dans des enquêtes génétiques portant sur des maladies héréditaires humaines (Wright A., et al., 1999). Il existe de nombreuses affections héréditaires qui sévissent de façon gravissime chez

certaines races de chien (Cancers, néphropathies, cardiopathies, rétinopathies, épilepsie...). L'analyse de la physiopathologie et de la clinique de ces maladies révèle en général une forte homologie entre l'homme et le chien dont la cause génétique peut être la même soit au niveau de la mutation, du gène, de la voie métabolique... Par exemple, les rétinites pigmentaires (RP) humaines correspondent aux Atrophies Progressives de la Rétine observées chez le chien (Lin C.T., et al., 2002).

Enfin, le recrutement de familles informatives sur la transmission de maladies héréditaires chez l'homme est souvent très difficile du fait de la forte hétérogénéité entre individus, de la faible étendue des descendance et des problèmes éthiques. En cela, le modèle génétique canin permet une alternative intéressante en pathologie comparée car en plus de la notion d'isolat génétique, de la facilité de recrutement pour la construction de pedigree informatifs pour des études génétiques, le chien présente une physiologie et un environnement proche de ceux de l'homme.

Comment rechercher les causes génétiques de maladies héréditaires grâce au modèle canin?

La problématique du groupe est d'identifier les gènes en cause dans des maladies génétiques ou de phénotypes d'intérêt spécifiques d'une ou quelques races.

→ Méthodes d'identification de gènes dans le cas d'une transmission monogénique :

La première méthode dite « gène candidat », consiste à rechercher des gènes potentiellement impliqués :

-Un Gène peut être un bon candidat métabolique lorsque il code une protéine nécessaire dans les voies métaboliques impliquées dans la maladie en question.

-Un Gène peut être un bon candidat quand il est connu pour être responsable du même phénotype dans une ou plusieurs autres espèces. Le travail consiste à tester ce gène chez le chien.

D'un point de vue technique, le/les gène(s) candidats seront séquencés pour des animaux atteints et sains, afin de déterminer la/les mutation(s) en cause. Il faut vérifier que la mutation observée est bien responsable du phénotype et ne correspond pas à un polymorphisme entre individus.

Une autre méthode d'analyse dite de « liaison génétique » consiste à rechercher une liaison entre des marqueurs chromosomiques et un caractère génétique étudié sur une famille de chiens dans laquelle ségrège le phénotype étudié. Pour cela, il faut procéder au génotypage de

marqueurs polymorphes comme les microsatellites. Ce sont de courtes séquences de 2 à 6 nucléotides répétées 10 à 30 fois en tandem, elles présentent des régions flanquantes composées de séquences uniques permettant de déterminer des amorces très spécifiques pour effectuer les réactions d'amplification génique (PCR). Le nombre de répétition de ce motif constitue un allèle qui est transmis à la descendance sur un mode mendélien. Ainsi, grâce à des logiciels dédiés à l'analyse de « liaison génétique » on peut mettre en exergue une région chromosomique liée au phénotype que l'on appelle « locus candidat ». Ces méthodes sont basées sur des analyses statistiques. Il reste ensuite à déterminer exactement quel gène est impliqué et quelle est la mutation en cause. Un locus candidat peut contenir de un à une centaine de gènes.

Une dernière méthode dite « études d'association » consiste à rechercher une liaison génétique entre des marqueurs chromosomiques et le caractère étudié par des approches statistiques différentes sur deux populations distinctes (atteints/sains).

Dans le groupe « génétique du chien », plusieurs projets de recherche de gènes impliqués dans des maladies génétiques sont en cours : que ce soit des cancers, des maladies métaboliques ou bien encore des anomalies du développement (voir plus loin).

Nous nous sommes donc intéressé à un caractère ségrégant dans certaines races canines qui concerne la longueur de la queue, voire son absence. En effet, dans certaines races ce caractère est recherché et a été conservé depuis plusieurs siècles malgré la létalité supposée des chiots “in utero”. Ceci pourrait expliquer un plus faible effectif observé dans des portées issues de croisement avec deux reproducteurs “queue courte”. Cette hypothèse est corroborée par le fait que des souris homozygotes pour cette mutation meurent au 10-11^{ème} jour après fécondation (Hermann et Kispert, 1994).

En fait, plus qu'un trait phénotypique anodin cette caractéristique révèle une anomalie du développement précoce dès les premiers jours de la vie au cours de la gastrulation lors de l'embryogénèse : cette “anomalie génétique” serait létale quand les deux allèles du gène T sont mutés, en revanche cette anomalie affecte uniquement la longueur de la queue pour les individus hétérozygotes (un seul allèle muté). Ici, j'ai utilisé une approche dite du « gène candidat », car une mutation dans un gène codant pour un facteur de transcription, le gène T a déjà été identifiée pour ce phénotype dans quelques races de chien (Haworth K., 2001). Mon

travail a consisté (1) à réaliser un pedigree de chiens de race Braque du Bourbonnais afin d'étudier la transmission génétique du phénotype « queue courte » dans cette race (2) à rechercher la mutation du gène T dans cette race, ainsi que chez le Berger australien et l'Épagneul breton.

II) Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre seront exposés les principes mais pas les protocoles.

II.1) Prélèvements, bases de données et pedigrees

Les prélèvements sanguins ont été obtenus auprès des éleveurs de Braque du Bourbonnais, d'Épagneul breton, de Berger australien et des vétérinaires. Toutes les informations concernant le chien sont ordonnées dans des bases de données (numéro de LOF ; nom de l'animal ; sexe ; phénotype ; filiation ; date de naissance ; quantité et qualité du prélèvement...) permettant ainsi une traçabilité. Les pedigrees sont construits avec le logiciel Cyrillic 2.1.3.. Ces données, propriété du CNRS, sont confidentielles.

II.2) Extraction de l'ADN

Les extractions d'ADN sont réalisées grâce au kit Nucleon BACC 2/3[®] (Amersham-Bioscience). Il permet, à partir des leucocytes circulants, d'extraire de l'ADN génomique de haut poids moléculaire (>200Kb). Cette extraction consiste en la lyse cellulaire des hématies puis des leucocytes suivie d'une déprotéinisation au perchlorate de sodium grâce à une résine. L'ADN est ensuite précipité dans de l'éthanol 70° froid et repris en tampon T₁₀E₁, puis dosé par un appareillage nanodrop[®].

II.3) Amplification d'ADN « tout génome » avec la polymérase GénomiPhi[®]

Si la concentration de l'ADN extrait est inférieure à 10ng.µl⁻¹, ou si la quantité d'échantillons importants s'épuise, on utilise un kit d'amplification d'ADN GénomiPhi[®] (Amersham-Bioscience). A partir d'un ng d'ADN source, grâce à des amorces dégénérées de petite taille (hexamères) et à une ADN polymérase fidèle du phage Phi 29, on obtient des fragments d'ADN d'une taille supérieure à 10Kb. Sans étape de purification, on peut alors réaliser des PCR avec des résultats similaires à ceux obtenus avec les solutions mères d'ADN extraits.

II.4) Séquençage

Les réactions de séquences sont effectuées selon la méthode de Sanger avec un kit BigDye (ABI) par incorporation de ddNTP fluorescents (Bleu/ddCTP, vert/ddATP, Rouge/ddTTP, Orange/ ddGTP) en présence d'une ADN polymérase sans activité exonucléasique 3'→5', et de dNTP.

Après purification sur gel G-50 Sephadex™, les échantillons sont déposés sur séquenceur capillaire (ABI Prism). La manipulation et la comparaison des séquences d'ADN obtenues sont effectuées grâce aux logiciels Phred, Phrap et Consed.

III) Résultats et analyse des causes génétiques donnant le phénotype « queue courte » dans quelques races canines

L'analyse des données de généalogie obtenues par M. Comte m'a permis de réaliser un pedigree pour les Braques du Bourbonnais (figure A) où le phénotype « queue courte » ségrége. Cette race reconstituée depuis les années 70 présente une forte consanguinité). Le mode de transmission ne peut y être gonosomique (5 mâles atteints contre 6 femelles). Il n'y a pas de saut de génération de cette anomalie suggérant une transmission autosomique dominante. Nous avons recherché si la mutation décrite par Haworth et al., chez le boxer et d'autres races était également en cause chez les Braques du Bourbonnais. La mutation (C295G) du gène T dans l'exon 1, correspond au remplacement d'une cytosine par une Guanine au niveau du 295ème nucléotide du premier exon du gène T. Pour cela l'exon 1 du gène T a été amplifié par PCR puis séquencé chez des chiens à “queue courte” (QC) et des chiens à “Queue longue” (QL) (B. Hédan et S. Seguin). L'amplification par PCR est ici réalisé en « touch down 59-49°C » .

Les résultats montrent que comme pour d'autres races, le phénotype « queue courte » est observé pour un hétérozygote C//G chez les Braque du Bourbonnais. Ce travail a également été effectué chez les Bergers australiens et les Epagneuls bretons, et là aussi les résultats montrent que cette mutation est retrouvée à l'état hétérozygote chez les chiens à “queue courte naturelle” (anoure ou brachyoure).

Cette mutation dans le gène T correspondant à une transversion C295G dans l'exon1 a pour conséquence une substitution d'acide aminé Ile63Met (un acide aminé Isoleucine remplace une méthionine au 63ème Acide aminé de la protéine) au niveau du domaine de liaison de la protéine T (facteur de transcription) à son ADN cible. Le phénotype anoure (pas de vertèbres sacrées) ou brachyoure (quelques vertèbres) est dominant (les chiens à queue courte sont hétérozygotes pour la mutation) (Haworth et al., 2001).

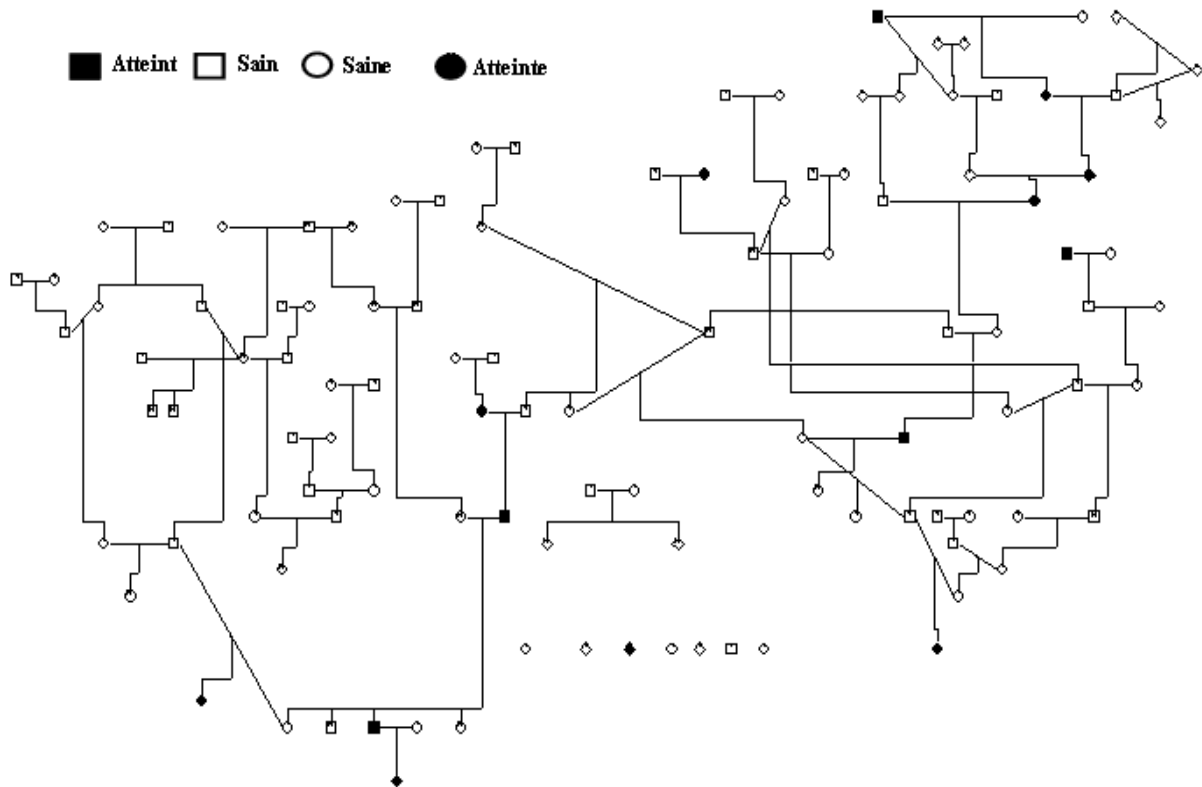


Figure A: Pedigree Braques du Bourbonnais où ségrége le caractère « queue courte » : anoure (Fig. A) ou brachyoure (Fig. B).

La même mutation a été retrouvée chez l'Épagneul breton pour l'expression de ce phénotype. Un individu anoure comme dans la figure B ou brachyoure comme dans la figure C présentent un génotype C//G et sont donc hétérozygotes pour ce gène, alors qu'un individu machyoure est homozygote C//C concordant avec un phénotype « queue de longueur normale » .



Figure B : Épagneul breton anoure



Figure C : Épagneul breton brachyoure

IV) Discussion

Sachant que pour un gène donné, chaque individu possède deux allèles dont un venant du père et l'autre de la mère, la caractérisation de chacun de ces allèles permet de définir le génotype de chaque animal. Un allèle normal du gène T sera noté “T” et un allèle muté sera noté “t”. Le génotype d'un individu hétérozygote (deux allèles différents) sera noté “T/t”, tandis qu'un animal homozygote (deux allèles identiques) sera noté “T/T” s'il possède deux allèles “T” (normaux) ou bien il sera noté “t/t” s'il possède deux allèles “t” (mutés).

La transmission du caractère “queue courte” est monogénique, c'est à dire liée à un seul gène. Celle-ci est dite autosomale (par opposition à gonosomale) car le gène en cause est porté par une paire d'autosomes (paires 1 à 38) par opposition aux chromosomes sexuels (X ou Y).

Un allèle d'un gène peut être dominant ou récessif par rapport à un autre allèle du même gène. Quand un allèle doit être en deux exemplaires pour s'exprimer il est dit récessif. Donc pour qu'un caractère récessif s'exprime dans une descendance les deux parents doivent être porteurs mais ne sont pas forcément atteints. En effet, un individu hétérozygote possédant un seul allèle muté récessif n'exprime pas ou très peu le caractère (ou la maladie).

Si l'allèle est dominant, une seule version est nécessaire et suffisante pour l'expression du phénotype muté et donc un individu hétérozygote (possédant un allèle normal et un allèle muté) exprimera toujours la mutation.

D'après le pedigree (figure A), il y a à peu près autant de mâles que de femelles atteints la transmission ne semble donc pas liée au sexe et serait autosomale. De plus, un chien “queue courte” (QC) a toujours au moins un parent “queue courte” (pour les chiens dont on est sûr du phénotype). Les chiens présentant une “queue longue” (QL) ne peuvent avoir qu'une descendance “queue longue” s'ils sont croisés entre-eux. La ségrégation autosomale dominante semble plausible et serait en accord avec celle observée dans d'autres races déjà décrites (Haworth et al, 2000). La mutation identifiée dans le gène T à l'état hétérozygote, chez le Braque du Bourbonnais, le Berger australien et l'Epagneul breton ségrège en même temps que le phénotype brachyoure ou anoure (QC). D'un point de vue phylogénétique, on peut dire que cette mutation est le résultat d'un « effet fondateur » très ancien chez un ancêtre commun à toutes ces races présentant ce phénotype. Une analyse statistique sur un plus grand

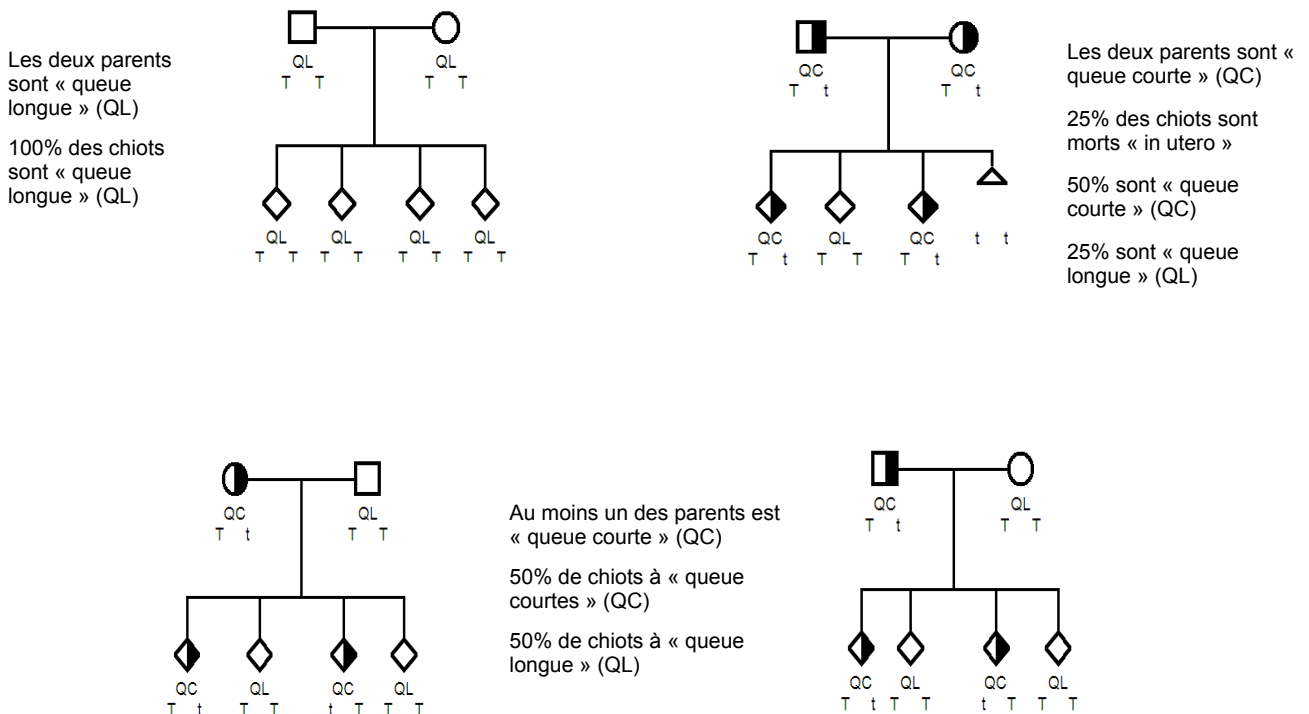
nombre de races présentant ce phénotype permettrait de dater cet événement et de reconstituer la phylogénie associée des races canines.

Afin d'expliquer les variations dans la longueur des queues (d'anoure à brachyoure), il faudrait rechercher d'autres mutations dans le même gène à d'autres endroits ou bien dans d'autres gènes intervenant dans le développement précoce du chien.

Croisements possibles et descendance attendues:

L'intérêt est de connaître le génotype des reproducteurs, afin de distinguer les chiens à “queue courte” naturellement des chiens à “queue longue” ayant subi une coupe de la queue.

Pour maintenir le phénotype “queue courte” et éviter les petites portées dues à la létalité “in utero”, il faudrait croiser des chiens naturellement “queue courte” avec des chiens à “queue longue”. Ainsi, statistiquement, la portée doit être constituée de 50% de chiens “queue longue” et 50% de chiens à “queue courte”. En revanche, les croisements effectués avec deux parents à “queue courte” conduisent statistiquement aussi à 50% de chiens à queue courte mais 25% de chiens morts “in utero” et 25% de chiens à “queue longue” (voir figure ci-dessous).



Par ailleurs, en pathologie comparée, une meilleure connaissance des causes de ce phénotype liées à cette mutation est assez importante. En effet, la protéine T aurait un rôle primordial dans la détermination du mésoderme prénotocordal et la formation de la notocorde, où est exprimé cette protéine au cours du développement précoce. Ceci peut expliquer pourquoi on peut corréler la présence de cette mutation avec des anomalies de développement des structures postérieures et une mortalité importante « in utero » (Wilson et al, 1995). On attribue en effet un lien entre certains allèles du gène T et des anomalies du type agénésie sacrale ou “Spina Bifida” humaines (Papapetrou et al, 1999).

V) Conclusion

En conclusion ces résultats permettent la mise au point de tests de diagnostique et de dépistage, ainsi qu’une meilleure connaissance en génétique canine.

De plus, concernant la problématique de la coupe des queues chez le chien, un test génétique permettra de savoir si un chien à “queue courte” l’est naturellement ou a subi une coupe de queue à la naissance. Ce résultat permettrait de réaliser les croisements appropriés pour conserver ce caractère “queue courte” dans ces races (Braque du Bourbonnais, Berger australien et Epagneul breton) tout en diminuant la létalité. En outre, compte tenu de la législation concernant la coupe des queues, il apparaît important de déterminer le caractère “queue courte” sans ambiguïté.

Bibliographie

CLUTTON-BROCK J., Origin of the dog: domestication and early history. In: Sherpell J., ed. The domestic dog, its evolution, behaviour and interactions with people. New York: Cambridge University Press, 1995: 7-20.

GALIBERT F., ANDRÉ C., HITTE C., Le chien un modèle pour la génétique des mammifères. Médecine/Sciences 2004 ; 20 :761-6.

HAWORTH K. et al., Canine homolog of the T-box transcription factor T; failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype. Mammalian Genome, 2001, 12.212-218.

HERMANN B.G. and KISPERT A., The T gene in embryogenesis. Trends Genet., 1994, 10, 280-286.

JOUQUAND S., CHÉRON A. et GALIBERT F., Microsatellite analysis using a two-step procedure for fluorescence labelling of PCR products, Biotechniques, 1999, 26, 902-905.

LEONARD J.A. et al., Ancient DNA evidence for OldWorld origin of new world dogs. Science. 2002 Nov 22; 298 (5598): 1613-6.

PAPAPETROU C. et al., A genetic study of human T gene and its exclusion as a major candidate gene for sacral agenesis with anorectal atresia. J. Med. Genet., 1999, 36, 208-213.

WILSON V. et al., Beddington RSP (1995) The T gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. Development 121. 877-886.

WRIGHT A. F. et al., Population choice in mapping genes for complex diseases. Nature genetics. Volume 23, décembre 1999.

Base OMIM : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Site séquences des génomes humain et canin : <http://www.genome.ucsc.edu/>

Site génétique du chien UMR 6061 : <http://www-recomgen.univ-rennes1.fr/doggy.html>