

ANALYSE MOLECULAIRE DE LA MUTATION « FAWN » DU GENE *AGOUTI* CHEZ LA CAILLE JAPONAISE

**Morisson Mireille¹, Leroux Sophie¹, Vignoles Florence¹, Bardou Philippe², Salin
Gérald³, Gourichon David⁴, Lluch Jérôme³, Klopp Christophe⁵, Pitel Frédérique¹ et
Minvielle Francis⁶**

¹ INRA-ENVT, UMR444 Laboratoire de Génétique Cellulaire, 31326 Castanet-Tolosan, France, ² INRA, Système d'Information des Génomes des Animaux d'Élevage, 31326 Castanet-Tolosan, France, ³ INRA - GeT-PlaGe Genotoul -, 31326 Castanet-Tolosan, France, ⁴ INRA, Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, 37380 Nouzilly, France, ⁵ INRA, Biométrie et Intelligence Artificielle, 31326 Castanet-Tolosan, France, ⁶ INRA-AgroParisTech - UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-En-Josas, France

mireille.morisson@toulouse.inra.fr

RÉSUMÉ

Dans le cadre du projet ANR EpiBird qui explore les mécanismes épigénétiques chez les oiseaux, nous nous sommes intéressés au gène *Agouti* chez la caille japonaise pour lequel plusieurs mutants phénotypiques ont été décrits dont le mutant fawn (ou beige) pour lequel la mutation causale n'est pas connue. Nous avons fait l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'une mutation semblable à la fameuse mutation *viable yellow* (A^{vy}) décrite chez la souris : dans ce modèle, l'expression du gène *Agouti* est régulée par le niveau de méthylation d'un rétrotransposon de type IAP (Intracisternal A Particle) inséré au niveau de la région promotrice du gène. Nous avons séquencé le gène *Agouti* dans son intégralité (région promotrice, région codante et région 3' non codante) ainsi qu'une région de 20 kb en amont de la région promotrice chez cinq individus. Il s'agit d'un individu présentant le phénotype sauvage (+/+) et de quatre individus présentant une mutation au gène *Agouti* : un individu de chacune des deux lignées présentant la mutation *fawn* (Y^f/Y^f), un individu de la lignée récessive black (rb/rb), et un individu hétérozygote sauvage/yellow (+/Y). Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Roche 454 puis les lectures ont été alignées sur la séquence du gène *Agouti* de la poule déjà publiée ou utilisées pour un assemblage *de novo*. Les résultats montrent que la mutation responsable du phénotype beige n'est pas de même nature que celle décrite chez la souris *viable yellow* (A^{vy}). En revanche plusieurs délétions et SNP ont été observés et des travaux sont en cours pour identifier la mutation causale.

ABSTRACT

Molecular analysis of the *Agouti* fawn mutation in the Japanese quail.

The aim of the project ANR EpiBird is to obtain first basic knowledge concerning epigenetic mechanisms in birds. Striking similarities are observed for the causal mutations of *Agouti* and their phenotypic effects in the Japanese quail and the mouse and we made the hypothesis that the expression of *Agouti* in fawn quails is possibly subjected to epigenetic control of an Intracisternal A Particle (IAP) inserted at the promoter region of the *Agouti* gene, like in *viable yellow* (A^{vy}) mouse. To check this hypothesis, we sequenced the whole *Agouti* region from a Japanese wild quail (+/+) as well as from four mutants: one individual from each of two fawn lines (Y^f/Y^f), a recessive black (rb/rb) individual and a heterozygous wild/yellow (+/Y) individual. The sequencing was carried out on a Roche 454 machine and reads were either aligned to the already published sequence of the chicken *Agouti* gene or used for *de novo* assembling. The results show that the mutation involved is not linked to the insertion of an IAP like in the *viable yellow* (A^{vy}) mouse. However, several indels and SNPs have been detected and further experiments are being carried out to identify the causal mutation.

INTRODUCTION

La pigmentation des poils chez les mammifères et des plumes chez les oiseaux est principalement déterminée par la distribution de deux types de mélanines, l'eumélanine (noir/marron) et la pheomélanine (jaune/rouge). Le gène *Agouti* code pour la protéine ASIP (agouti-signaling protein) qui est un antagoniste de la fixation de l'hormone α -MSH sur le récepteur aux mélanocortines 1 (MCR1) et permet ainsi l'arrêt de la synthèse d'eumélanine pour la synthèse de pheomélanine dans les mélanocytes (Girardot, 2005). Le gène *Agouti* est particulièrement bien connu chez la souris où de nombreuses mutations ont été décrites (**Figure 1**). Parmi elles, la mutation *Lethal Yellow* (A^y) conduit à une surexpression du gène *Agouti* et donc à une synthèse très élevée de protéine ASIP menant à une coloration jaune uniforme et de surcroît à des effets pléiotropes dominants dont l'obésité. Cette surexpression est due à une délétion d'environ 170kb en amont du gène qui le positionne sous le contrôle du promoteur du gène *Raly*. Une autre mutation présente l'effet inverse, interdisant toute synthèse de la protéine ASIP. Il s'agit de la mutation récessive *a* (non-agouti) qui conduit à des souris entièrement noires. Une troisième mutation, certainement la plus connue et la plus étudiée, est la mutation *viable yellow* (A^{vy}). Elle est due à l'insertion d'un rétrotransposon de type IAP (Intracisternal A Particle) inséré dans la région promotrice du gène. Sa particularité vient de l'observation d'une variabilité phénotypique de la couleur du pelage, allant du jaune au marron, qui est consécutive à l'état de méthylation de l'IAP. En effet, plus l'IAP est méthylé, plus son activité promotrice est réduite et plus le pelage de l'animal est foncé. En revanche, si la méthylation de l'IAP est réduite, l'expression du gène *Agouti* est accrue et l'animal est de couleur jaune et obèse. L'activité promotrice est donc directement dépendante de l'état de méthylation : on parle d'épiallèles métastables. Certains auteurs ont tiré parti de cette caractéristique pour étudier l'influence de l'environnement et particulièrement du régime alimentaire sur l'état de méthylation du génome, faisant de la souris *viable yellow* (A^{vy}) un très bon détecteur, directement par son phénotype, de l'impact de certains contaminants (Anderson *et al.*, 2012, Dolinoy *et al.*, 2006, Dolinoy *et al.*, 2007, Dolinoy, 2008, Waterland *et al.*, 2003, Waterland, 2006). Il s'agit là de l'étude d'un phénomène qui conduit à une modification du phénotype par l'acquisition d'une marque épigénétique ; la méthylation de l'ADN. En effet, pour un même génotype (présence de l'IAP), c'est bien son niveau de méthylation qui impacte le phénotype.

Chez la caille japonaise (*Coturnix japonica*), plusieurs mutations ont également été rapportées pour le gène *Agouti* (**Figure 2**). Comme chez la souris, la mutation

yellow (Y) est létale et est également due à une délétion en amont du gène *Agouti* qui le localise sous la dépendance du promoteur du gène *Raly* ce qui conduit à une surexpression de la protéine ASIP (Nadeau *et al.*, 2008). A l'inverse, la mutation *recessive black* (rb) interdit la production d'une protéine ASIP active du fait d'une délétion de 8pb au niveau de la région codante (Hiragaki *et al.*, 2008). De ce fait, l'animal porteur de cette mutation est entièrement noir. La mutation *fawn* (Y^f) qui induit une couleur beige a été décrite phénotypiquement (Minvielle *et al.*, 2003) mais reste non identifiée au niveau moléculaire. Nous avons fait l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'une mutation semblable à la fameuse mutation *viable yellow* (A^{vy}) décrite chez la souris. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons séquencé le gène *Agouti* dans son intégralité (région promotrice, région codante et région 3' non codante) ainsi qu'une région de 20 kb en amont de la région promotrice chez cinq individus. Il s'agit d'un individu présentant le phénotype sauvage (+/+) et de quatre individus présentant une mutation au gène *Agouti* : un individu hétérozygote sauvage/yellow (+/Y), un individu pour chacune des deux lignées présentant la mutation *fawn* (Y^f/Y^f), et un individu de la lignée portant la mutation *recessive black* (rb/rb).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Les lignées de cailles japonaises utilisées

Les cailles japonaises utilisées sont maintenues au Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (PEAT). Il s'agit de la lignée sauvage (+/+), de la lignée récessive black (rb/rb), de deux lignées de cailles beiges (ou *fawn* Y^f/Y^f) ; la première, nommée Nouzilly, provient d'une lignée commerciale française et la seconde, nommée Gifu, provient d'un laboratoire japonais et, enfin, d'individus hétérozygotes au locus *Agouti* permettant le maintien de la mutation *yellow* (+/Y).

1.2 Le séquençage

L'ADN d'un individu pour chacune des cinq lignées a été extrait à partir d'échantillons de sang par une méthode d'extraction rapide (Roussot *et al.*, 2003). Nous nous sommes ensuite appuyés sur les données de séquençage du génome et de transcrits chez la poule et la caille japonaise (Ensembl : <http://www.ensembl.org/index.html> et UCSC : <http://genome.ucsc.edu/>) pour définir des amorces permettant d'amplifier la région du gène *Agouti* en six fragments dont les tailles varient de 7 à 12,5kb. Les amplifications ont été réalisées à l'aide du kit Long PCR Enzyme Mix (Fermentas) et les fragments obtenus ont été dosés avec le kit Quant-iT™ ds DNA assay (Invitrogen) sur l'appareil ABI 7900 (Applied Biosystems) qui dose l'ADN double brin. Les fragments ont ensuite été mélangés par individu en quantité proportionnelle à la taille de chaque fragment pour obtenir une couverture homogène. Ils ont ensuite été séquencés sur un appareil Roche 454 Life

Sciences Genome Sequencer FLX, suivant les instructions du fournisseur.

1.3. L'alignement et l'assemblage

En l'absence de génome de référence chez la caille, les lectures obtenues ont été alignées sur le génome de la poule (assemblage de mai 2006 chicken (*Gallus gallus*) v2.1), en utilisant le programme bwa, option bwasw (Li *et al.*, 2009). Les résultats ont été visualisés grâce au logiciel IGV (Robinson *et al.*, 2011). Enfin, un assemblage *de novo* des lectures a été réalisé à l'aide du logiciel Newbler (v2.3), pour chacune des lignées étudiées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. L'alignement et l'assemblage

Pour chacune des cinq lignées étudiées, plus de 7000 lectures d'une taille moyenne de 400pb ont été obtenues par séquençage sur un séquenceur Roche 454. Ces lectures ont été alignées sur la séquence du gène *Agouti* de la poule (utilisée comme séquence de référence) et les résultats ont été visualisés en utilisant le logiciel IGV. Les alignements montrent qu'il existe de nombreuses délétions dans la séquence de la caille par rapport à la séquence de la poule. Cependant, l'une d'entre elles n'est retrouvée que chez les deux lignées de cailles portant la mutation *fawn* (Gifu et Nouzilly). En revanche, ce type d'alignements ne permet pas de visualiser d'éventuelles insertions (par exemple de type IAP) dans les séquences de cailles. Nous avons ensuite utilisé les lectures pour réaliser, chez chacune des lignées, un assemblage *de novo* à l'aide du logiciel Newbler. Il n'a pas été possible d'obtenir un seul long contig recouvrant l'ensemble de la séquence d'intérêt (**Figure 3**) du fait de l'existence d'une répétition d'environ 500pb chez chacune des lignées. D'autre part, l'assemblage est

plus délicat pour l'individu hétérozygote (+/Y) et l'individu sauvage (+/+) pour lesquels nous avons obtenu de nombreux contigs. Nous avons ensuite orienté puis assemblé les contigs, en nous basant sur la séquence de référence chez la poule, pour obtenir un assemblage complet pour chacune des lignées.

2.2. La détection d'indels et de SNP spécifiques

Nous avons aligné les cinq séquences obtenues (sur le site NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ce qui nous a permis de les comparer entre elles et d'identifier des courtes délétions et insertions (indels) ainsi que quelques SNP. Ces résultats nous permettent d'affirmer qu'il n'existe pas d'insertion spécifique aux deux lignées de phénotype *fawn* et donc d'écarter un mécanisme moléculaire du même type que chez la souris *viable yellow* (A^{vy}). En revanche, quelques SNP et indels spécifiques de ces deux lignées ont été repérés et tout particulièrement la longue délétion, observée lors de l'alignement des lectures sur la séquence de la poule (section 2.1.), est bien confirmée. Elle concerne 313pb (**Figure 4**).

CONCLUSION

La mutation à l'origine du phénotype *fawn* n'est pas de même nature que la mutation *viable yellow* décrite chez la souris. Cette étude nous a néanmoins permis d'identifier des modifications (indels et SNP) spécifiques des deux lignées *fawn*. Des analyses complémentaires doivent être menées pour identifier, parmi elles, la mutation causale et pour en expliquer le mécanisme moléculaire.

REMERCIEMENTS

Ce travail est financé par l'ANR (EpiBird ANR-009-GENM-004). Le séquençage haut-débit a été réalisé sur la plate-forme GeT-PlaGe Genotoul de Toulouse Midi-Pyrénées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson OS, Nahar MS, Faulk C, Jones TR, Liao C, Kannan K, Weinhouse C, Rozek LS et Dolinoy DC, 2012. Environ Mol Mutagen, (53), 334-42.
- Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA et Jirtle RL, 2006. Environ Health Perspect, (114), 567-72.
- Dolinoy DC, Huang D et Jirtle RL, 2007. Proc Natl Acad Sci U S A, (104), 13056-61.
- Dolinoy DC, 2008. Nutr Rev, (66 Suppl 1), S7-11.
- Girardot, M 2005. Thèse de l'Université de Limoges <http://epublications.unilim.fr/theses/2005/girardot-michael/girardot-michael.pdf>
- Hiragaki T, Inoue-Murayama M, Miwa M, Fujiwara A, Mizutani M, Minvielle F et Ito S, 2008. Genetics, (178), 771-5.
- Li H et Durbin R, 2009. Bioinformatics, (25), 1754-60.
- Minvielle F, Gourichon D et Monvoisin JL, 2003. J Hered, (94), 517-22.
- Minvielle F, 2009, World's Poultry Science Journal, (65), 601-608
- Nadeau NJ, Minvielle F, Ito S, Inoue-Murayama M, Gourichon D, Follett SA, Burke T et Mundy NI, 2008. Genetics, (178), 777-86.
- Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G et Mesirov JP, 2011. Nat Biotechnol, (29), 24-6.
- Roussot O, Feve K, Plisson-Petit F, Pitel F, Faure JM, Beaumont C et Vignal A, 2003. Genet Sel Evol, (35), 559-72.
- Waterland RA et Jirtle RL, 2003. Mol Cell Biol, (23), 5293-300.
- Waterland RA, 2006. J Nutr, (136), 1706S-1710S.

Figure 1. Différentes mutations phénotypiques du gène *Agouti* chez la souris

La structure du gène *Agouti*, présentée au centre de la figure, est reprise de Girardot (2005). La région promotrice comprend les éléments 1A, 1B et 1C. La partie codante est située au niveau des éléments 2, 3 et 4. Enfin, la partie 3' non codante du gène est localisée à la fin de l'élément 4. La mutation *Lethal Yellow* (A^Y) est due à une large délétion en amont du gène qui le positionne sous le contrôle du promoteur du gène *Raly*. La mutation récessive *a*, interdisant toute synthèse de la protéine, conduit à des souris entièrement noires. La mutation *viable yellow* (A^{vy}) est due à l'insertion d'un rétrotransposon de type IAP inséré dans la région promotrice du gène.

D'après Girardot (2005), Dolinoy et al. (2006) et Minvielle (2009).

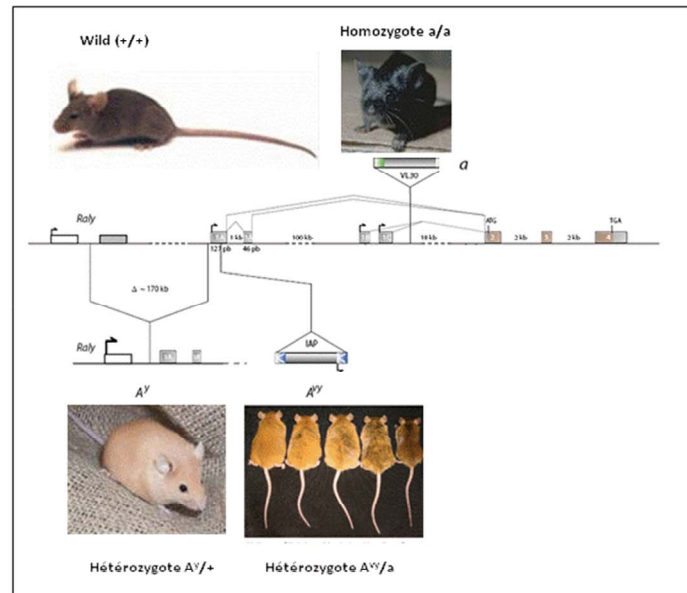


Figure 2. Les différentes mutations phénotypiques du gène *Agouti* chez la caille japonaise

Les mutations causales des phénotypes yellow et récessive black ont été décrites. En revanche, les deux lignées, Nouzilly et Gifu, de phénotype fawn (mutation autosomale dominante), sont en cours d'analyse au niveau moléculaire afin d'identifier la mutation causale. La structure du gène *Agouti* chez la caille, présentée au centre de la figure, a été construite d'après les données trouvées dans les deux bases de données, Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) et UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) : les régions colorées en marron foncé sont les régions codantes alors que les régions colorées en clair sont les parties non codantes du gène.

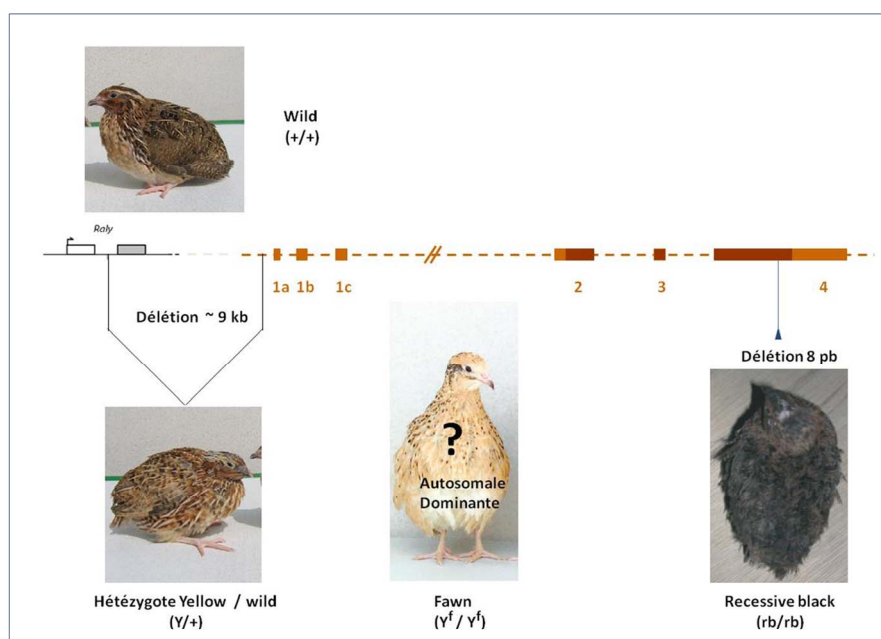
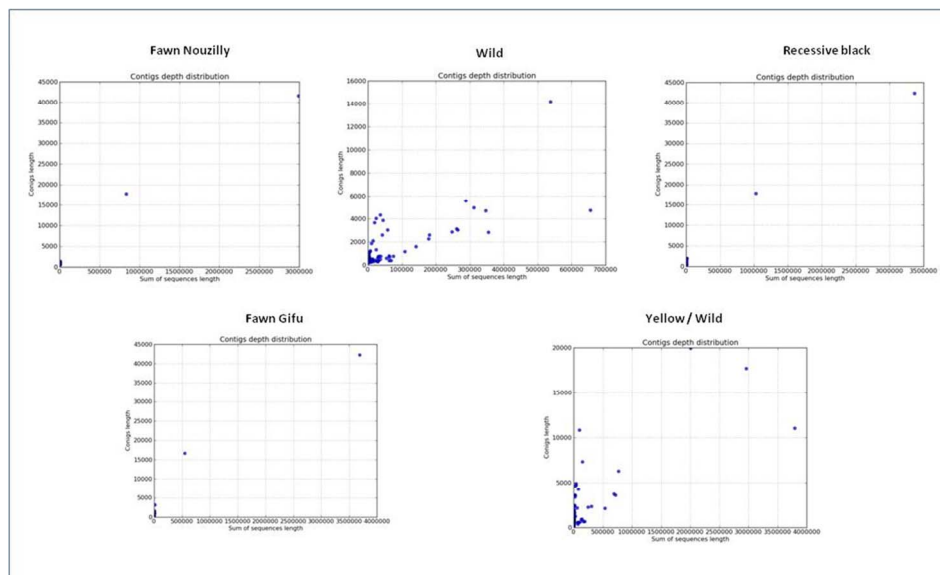


Figure 3. Résultats de l'assemblage *de novo* pour chacune des lignées de caille

La taille des contigs (en ordonnée) est représentée en relation avec la taille totale des séquences qu'ils contiennent (en abscisse). L'assemblage conduit à deux longs contigs pour les individus Fawn Nouzilly, Fawn Gifu et recessive black. En revanche, un nombre plus important de contigs est obtenu pour l'animal hétérozygote Yellow/Wild et l'animal homozygote sauvage (Wild)

**Figure 4. La principale délétion observée chez les deux lignées portant la mutation *fawn*.**

L'alignement des cinq assemblages obtenus montre de nombreux indels et SNP par comparaison à la séquence de la lignée sauvage (marquée d'une flèche). On confirme, entre autres, l'importante délétion de 313pb chez les lignées portant la mutation *fawn* (Nouzilly et Gifu, présentées ici sur les 2 premières lignes).

```

Nouzilly  GGACAATGCTTCTTTAGGTGAGCCAGCTGTACCACACAAGTCTCTCCAATGAAATCCAA 43 343
Gifu      GGACAATGCTTCTTTAGGTGAGCCAGCTGTACCACACAAGTCTCTCCAATGAAATCCAA 43 319
Wild      GGACAATGCTTCTTTAGGTGAGCCAGCTGTACCACACAAGTCTCTCCAATGAAATCCAA 43 424
Yellow    GGACAATGCTTCTTTAGGTGAGCCAGCTGTACCACACAAGTCTCTCCAATGAAATCCAA 43 414
Black     GGACAATGCTTCTTTAGGTGAGCCAGCTGTACCACACAAGTCTCTCCAATGAAATCCAA 43 374
*****

Nouzilly  GCCTTTTATCCCTGAG----- 43 360
Gifu      GCCTTTTATCCCTGAG----- 43 336
Wild      GCCTTTTATCCCTGAGTTAATCAGGCTGGTTAATGGCTTGTGCCACACATTCATGT 43 484
Yellow    GCCTTTTATCCCTGAGTTAATCAGGCTGGTTAATGGCTTGTGCCACACATTCATGT 43 474
Black     GCCTTTTATCCCTGAGTTAATCAGGCTGGTTAATGGCTTGTGCCACACATTCATGT 43 434
*****

Nouzilly  -----
Gifu      -----
Wild      TGCTTCTAATCCGACACTCCTCACACTTCAACAAGTTTGTCTTTACAACTAGAATCA 43 544
Yellow    TGCTTCTAATCCGACACTCCTCACACTTCAACAAGTTTGTCTTTACAACTAGAATCA 43 534
Black     TGCTTCTAATCCGACACTCCTCACACTTCAACAAGTTTGTCTTTACAACTAGAATCA 43 494
*****

Nouzilly  -----
Gifu      -----
Wild      GAGTTATACCTTCCCTCTGGCTAACTTCTGACTCTCTTAGAAAAGTGTGGACATGCCAT 43 604
Yellow    GAGTTATACCTTCCCTCTGGCTAACTTCTGACTCTCTTAGAAAAGTGTGGACATGCCAT 43 594
Black     GAGTTATACCTTCCCTCTGGCTAACTTCTGACTCTCTTAGAAAAGTGTGGACATGCCAT 43 554
*****

Nouzilly  -----
Gifu      -----
Wild      GAATGTAGCAGATAGCCATATTTTGGCAACAGATACTCAAGACAGCAAAATCTCCT 43 664
Yellow    GAATGTAGCAGATAGCCATATTTTGGCAACAGATACTCAAGACAGCAAAATCTCCT 43 654
Black     GAATGTAGCAGATAGCCATATTTTGGCAACAGATACTCAAGACAGCAAAATCTCCT 43 614
*****

Nouzilly  -----
Gifu      -----
Wild      AATGCTAACAGGACTTTTGGCTTTTAAATGGCTCTGAAATGCC TCACAAAAGCATTCTCT 43 724
Yellow    AATGCTAACAGGACTTTTGGCTTTTAAATGGCTCTGAAATGCC TCACAAAAGCATTCTCT 43 714
Black     AATGCTAACAGGACTTTTGGCTTTTAAATGGCTCTGAAATGCC TCACAAAAGCATTCTCT 43 674
*****

Nouzilly  -----CAAATAAGGGGGTAAATGTAAAGCAAAACAG 43 390
Gifu      -----CAAATAAGGGGGTAAATGTAAAGCAAAACAG 43 366
Wild      CCTCTCTGCAAGATCCACATCATCGCACAGCAAACTAAGTGGGTAAATGTAAAGCAAAACAG 43 784
Yellow    CCTCTCTGCAAGATCCACATCATCGCACAGCAAACTAAGGGGGTAAATGTAAAGCAAAACAG 43 774
Black     CCTCTCTGCAAGATCCACATCATCGCACAGCAAACTAAGGGGGTAAATGTAAAGCAAAACAG 43 734
*****

Nouzilly  TGTTCATCCTCCTGTATGCATACAAAAAGAAATGAGCATTTAAATCCAAAGTGAAGAAT 43 450
Gifu      TGTTCATCCTCCTGTATGCATACAAAAAGAAATGAGCATTTAAATCCAAAGTGAAGAAT 43 426
Wild      TGTTCACCTCCTGTATGCATACAAAAAGAAATGAGCATTTAAATCCAAAGTGAAGAAT 43 444
Yellow    TGTTCATCCTCCTGTATGCATACAAAAAGAAATGAGCATTTAAATCCAAAGTGAAGAAT 43 834
Black     TGTTCATCCTCCTGTATGCATACAAAAAGAAATGAGCATTTAAATCCAAAGTGAAGAAT 43 794
*****

```

