

DETECTION DE QTL DE RESISTANCE A LA PASTEURELLOSE

**Gunia M.^{1*}, Debbiche R.¹, Bed'hom B.², Demars J.¹, Gilbert H.¹, Guitton E.³, Helies V.¹,
Lantier F.⁵, Maupin M.⁶, Robert R.⁶, Labrune Y.¹, Garreau H.¹**

¹GenPhySE, INRAE, Université de Toulouse, ENVT, 31326, Castanet-Tolosan, France

²ISYEB - Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité, 75005 Paris, France

³PFIE, INRAE Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

⁵Département Santé Animale, INRAE, 37380 Nouzilly, France

⁶HYPHARM SAS, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

*Auteur correspondant : melanie.gunia@inrae.fr

Résumé – La pasteurellose est la première cause de mortalité des femelles en élevage cunicole. Lors du projet RELAPA, 964 lapins de 6 lignées ont été inoculés à l'âge de 6 semaines avec une souche pyogène de *Pasteurella multocida* et leur réponse à l'infection a été suivie pendant 14 jours. Différents caractères de résistance à la pasteurellose ont été enregistrés. Parmi ces lapins, 921 ont été génotypés avec la puce lapin contenant près de 200 000 marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism). Après contrôle qualité, de 82 353 à 107 539 SNP ont été conservés suivant les lignées, et 919 lapins (de 137 à 175 lapins par lignées) ont été retenus pour les études d'association pangénomique. Le logiciel GEMMA a été utilisé, en appliquant un modèle mixte animal utilisant une régression linéaire pour chaque SNP. Au total, 93 SNP, répartis sur 9 chromosomes et dans 5 lignées, sont associés à des caractères de résistance à la pasteurellose ou de croissance pré-sevrage.

Abstract –QTL detection for pasteurellosis resistance. Pasteurellosis is the first cause of female mortality in rabbit farms. During the RELAPA project, 964 rabbits were inoculated at 6 weeks of age with a pyogenic strain of *Pasteurella multocida* and their response to the infection was monitored during 14 days. Various pasteurellosis resistance traits were registered. Among those rabbits, 921 were genotyped with the rabbit chip containing almost 200 000 SNP (single nucleotide polymorphism) markers. After quality control, 82,353 to 107,539 SNP (depending on the rabbit line) and 919 rabbits (from 137 to 175 rabbits per line) were retained for association analyses. The GWAS were performed using the GEMMA software, applying a mixed animal model with a linear regression on each SNP. In total, 93 SNP detected on 9 chromosomes and in 5 rabbit lines were associated with pasteurellosis resistance or pre-weaning growth.

Introduction

La pasteurellose est une maladie d'origine bactérienne touchant principalement les femelles en maternité, pour lesquelles c'est l'une des premières causes de mortalité (Lopez et al., 2013). Les premières études génétiques de cette maladie chez le lapin, après inoculation expérimentale, ont montré qu'il existait une variabilité d'origine génétique à la résistance à la pasteurellose, avec des héritabilités variant de $0,09 \pm 0,05$ à $0,16 \pm 0,06$ (Shrestha et al., 2019, 2020). Pour identifier l'origine de cette variabilité génétique, nous avons effectué des études d'association pangénomiques (ou GWAS). Le but de ces études d'association pangénomiques était de mettre en évidence des régions du génome (QTL, Quantitative Trait Locus) liées à la résistance à la pasteurellose.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

Les expérimentations ont été conduites en 2016 et 2017 selon les législations européenne et française (Directive 2010/63/EU, 2010 ; Code rural, 2018 ; Décret n°2013-118, 2013). Toutes les procédures expérimentales ont été validées par le ministère de la Recherche et de l'Éducation (APAFIS#3866-2016020113447262) et par le comité d'éthique du Centre Val de Loire n°19.

A l'installation expérimentale sur les ovins et les lapins INRAE (IE GenPhySE, INRAE, 2023), 1 030 lapins provenant du croisement de 65 mâles de 6 lignées maternelles (deux lignées pour chaque entreprise de sélection : EUROLAP, HYCOLE, et HYPHARM) et de 112 femelles de la lignée maternelle INRA1777 ont été élevés en 5 bandes, chaque bande comprenant toutes les lignées. Dans cette publication, les lignées des lapins croisés obtenus seront nommées A, B, C, D, E, et F. Le lendemain du sevrage, à l'âge de 36 jours, les lapins ont été transportés à la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (INRAE PFIE, Nouzilly). Parmi les 50 témoins et 980 lapins à inoculer, 16 lapins sont morts ou ont été euthanasiés avant l'inoculation pour cause de troubles digestifs, principalement d'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL). L'EEL est une maladie gastro-intestinale qui peut être létale et dont l'étiologie est inconnue. A l'âge de 42 jours, 964 lapins ont reçu une injection sous-cutanée entre les omoplates d'une dose de 8000 bactéries/0,1 mL de la souche pyogène LVT62 de *Pasteurella multocida*. Le statut sanitaire des lapins a été contrôlé quotidiennement durant les 14 jours suivant l'inoculation. Le protocole est détaillé par Shrestha et al. (2019, 2020).

1.1. Caractères mesurés

Les caractères enregistrés étaient le gain moyen quotidien entre la naissance et le sevrage (GMQ-presev), et la croissance la première semaine (GMQ-PI1) et deux semaines (GMQ-PI2) après inoculation.

Une autopsie a été réalisée sur tous les lapins de l'essai, durant laquelle les signes et lésions de pasteurellose étaient enregistrés. Une note évaluant le nombre et l'emplacement des abcès sur chaque partie du corps (point d'inoculation, parties avant, parties arrière du lapin, organes internes) a été attribuée. La note de « 0 » était attribuée aux lapins ne présentant aucun abcès. Les notes de 1 à 4 correspondaient à une localisation des abcès à distance croissante du site d'inoculation (entre les omoplates, noté 1) jusqu'au corps entier (noté 3), et aux organes internes (foie, rate, poumons, cavités pleurale et péritonéale, noté 4). A partir d'échantillons de foie, poumons, rate et abcès, mis en culture pour l'identification et la quantification de *Pasteurella multocida*, une note « Bactérie » a été définie de 0 à 4, afin d'évaluer l'importance de la colonisation bactérienne. La note de 0 était attribuée aux lapins sans *Pasteurella multocida* détectée tandis que les notes de 1 à 4 correspondaient à une dissémination croissante des bactéries dans le corps. Un caractère composite de Résistance a été créé à partir de la combinaison des critères utilisés pour créer les notes d'Abcès et de Bactérie. Une note de 4 a été attribuée aux lapins les plus résistants (ni abcès ni bactérie détecté). Les notes de 3 à 0 représentent une résistance de plus en plus faible à la pasteurellose (Shrestha et al., 2020).

1.2. Génotypages et contrôle qualité

Des biopsies ont été prélevées au niveau du cartilage des oreilles des lapins post-mortem. L'ADN a été extrait des biopsies d'oreilles disponibles pour 1 095 animaux (les 173 parents et 922 lapins parmi les 964 inoculés). Ces échantillons ont été génotypés à l'aide de la puce Affymetrix Axiom Rabbit 200K Genotyping Array (Santa Clara, CA, USA) contenant 199 692 marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism) par la plateforme Gentyane INRAE Clermont. L'ordre et la position des marqueurs SNP sur le génome étaient basés sur l'assemblage Rabbit OryCun2.0 publié par le Broad Institute of MIT et Harvard (Carneiro et al., 2014). Un contrôle qualité en deux étapes a été effectué à l'aide du logiciel PLINK v1.90 (Purcell et al, 2007) avant de procéder aux études d'association pangénomique. La première étape a été appliquée à l'intégralité de la population génotypée. Seules les données des SNP localisés sur les autosomes ont été conservées, ainsi que les SNP et les animaux présentant moins de 5% de valeurs manquantes ; 147 501 SNP et 1 089 animaux ont été conservés à cette étape. La deuxième étape a été effectuée population par population, en appliquant les mêmes règles de contrôle qualité : suppression des SNP présentant une MAF (Minor Allelic Frequency ou Fréquence de l'allèle mineur) inférieure à 5%, suppression des échantillons avec plus de 5% de SNP manquants et dont la p-valeur du test d'équilibre d'Hardy-Weinberg est inférieure à 10^{-7} . Les nombre d'animaux et de SNP conservés par lignée après le contrôle qualité sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Nombre de SNP et d'animaux par lignée après contrôle qualité des génotypes

Lignée	Nombre d'animaux	Nombre de SNP après contrôle qualité	Nombre de tests indépendants
A	142	106 750	19 167
B	137	107 539	17 728
C	145	82 353	10 473
D	153	93 562	15 213
E	167	102 231	18 125
F	175	104 346	18 993

1.3. Analyses statistiques

Les effets fixes utilisés dans le modèle avaient été définis précédemment (Shresta et al., 2019). Les effets fixes retenus étaient la bande, pour tous les caractères sauf GMQ-presev, l'observation de signe d'EEL pour tous les caractères sauf GMQ-PI2, et la durée de gestation et le rang de portée pour le GMQ-presev. Ces effets fixes ont été estimés pour l'ensemble des animaux, indépendamment de la lignée. Les études d'association pangénomiques pour chaque caractère (corrigées des effets fixes mentionnés) pour chaque lignée ont été menées avec le logiciel GEMMA version 0.94.1 (Zhou et Stevens, 2012). Cette étude se base sur un modèle linéaire mixte incluant l'effet aléatoire génétique de l'animal, où chaque SNP est testé individuellement. La matrice de parenté utilisée est une matrice génomique. La significativité de chaque SNP était évaluée. Afin de prendre en compte les tests multiples, le seuil de significativité des p-values a été fixé en utilisant la correction de Bonferroni avec la méthode SimpleM (Gao et al., 2010). Cette méthode permet d'établir le nombre de test indépendants en prenant en compte la matrice de corrélation des génotypes SNP. Ces nombres de tests indépendants variaient entre populations. Ils sont présentés en Table 1. Le seuil corrigé pour une p-value=0,05 est alors de $-\log_{10}(0,05/\text{nombre de tests indépendants})$. Pour toutes les population ce seuil était de 5,5, sauf pour la population C pour laquelle le seuil était de 5,3.

2. Résultats et discussion

Au total 93 SNP ont été détectés répartis sur 9 chromosomes et 5 lignées (Tableau 2). Quatre des six lignées présentent des SNP associés à des caractères de résistance à la pasteurellose, et une seule lignée présentait des SNP associés à la croissance en pré-sevrage (avant inoculation). Le nombre de SNP significatifs par caractère variait de 9 pour Bactérie à 31 pour GMQ-PI1. Aucun SNP significatif n'a été détecté pour GMQ-PI2.

Les p-valeurs d'associations entre les caractères et les SNP pour les lignées D, E, F sont présentés sous forme de diagrammes de Manhattan (Figures 1,2 et 3). Les SNP significatifs sont au-dessus de la ligne horizontale rouge. La seule lignée présentant des SNP significatifs pour le GMQ-presev était la lignée D (Figure 1), avec

un effet sur la croissance (-0,98 g/jour). Des SNP significativement associés à GMQ-P1 ont été retrouvés sur 6 chromosomes dans 4 lignées. Leur localisation différait selon les lignées. Les SNP avaient un effet sur la croissance, de +14 à + 20 g/jour. Des SNP significativement associés à la note d'Abcès ont été retrouvés sur deux régions du chromosome 1 dans la lignée F, avec un effet favorable de leur allèle mineur de diminution de la dissémination des abcès sur le corps de l'animal. Dans cette même lignée, des SNP associés à la note de Bactérie ont aussi été détectés, sur les chromosomes 4 et 7, avec un effet plutôt défavorable de leur allèle mineur traduisant une plus grande dissémination de l'infection par *Pasteurella multocida*. Dans la lignée E, 11 SNP étaient significativement associés avec la note de Résistance, avec un effet favorable de leur allèle mineur.

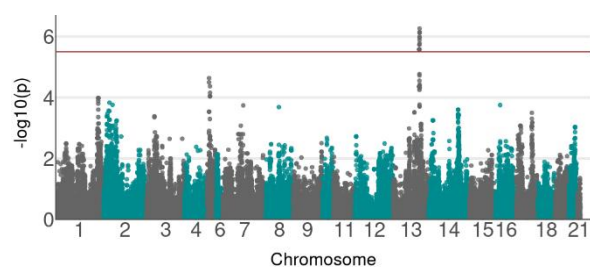


Figure 1 : Diagrammes de Manhattan en lignée D pour GMQ-presev (croissance avant le sevrage)

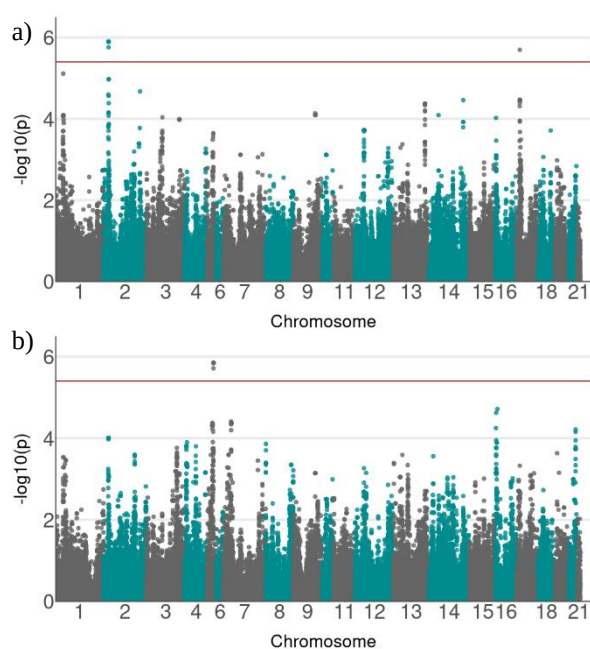


Figure 2 : Diagrammes de Manhattan en lignée E pour a) le GMQ-PI1 (croissance la 1ère semaine après inoculation) et b) Résistance.

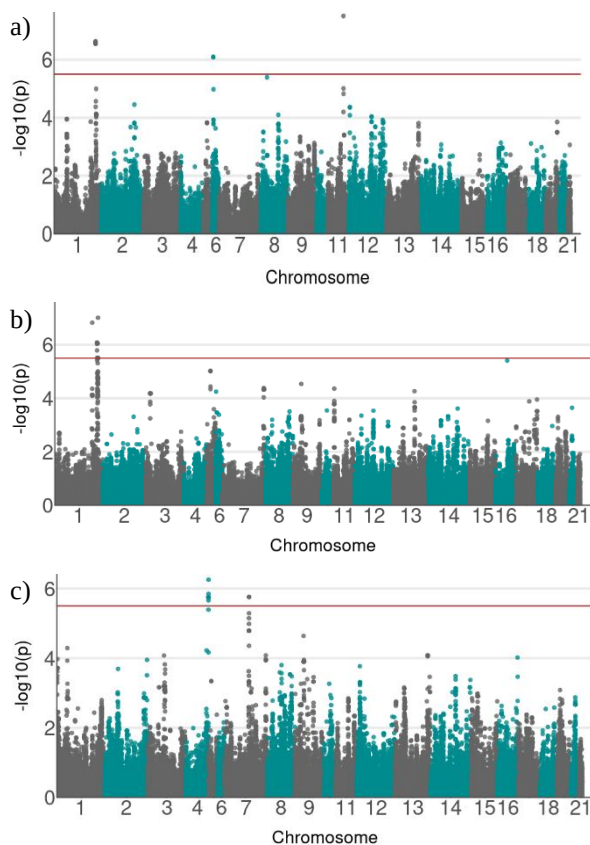


Figure 3 : Diagrammes de Manhattan en lignée F pour les caractères : a) GMQ-PI1 (croissance la 1ère semaine après inoculation, b) Abcès et c) Bactérie.

La lignée F présentait le plus grand nombre de SNP significatifs, avec 40 SNP pour 3 caractères (GMQ-PI1, Abcès, Bactérie) et avec 5 SNP sur le chromosome 1

associés à la fois à la note d'Abcès et au GMQ-PI1. Cette zone du génome du lapin contient plusieurs gènes, dont DCDC1, ELP4, IMMP1L, PAX6, RCN1, WT1, EIF3M, CCDC73, PRRG4, QSER1, TCP11L1, CSTF3. RCN1 est un gène candidat positionnel et fonctionnel intéressant. Les toxines libérées par *Pasteurella multocida* mobilisent des signalisations calcium-dépendantes (Aminova et al., 2008 ; Staddon et al., 1991). RCN1 contient un domaine de fixation du calcium et est impliqué dans la pyroptose (mort cellulaire inflammatoire) (Stelzer et al., 2016), il pourrait donc jouer un rôle contre ces toxines.

Les résultats de cette étude ainsi que ceux de Shrestha et al. (2019,2020) montrent donc qu'il est possible de sélectionner les lapins pour leur résistance à la pasteurellose et que plusieurs régions du génome sont liées à différents caractères de résistance à cette maladie. Ces régions sont différentes d'une lignée à l'autre, ce qui suggère des mécanismes biologiques de résistance variables suivant les lignées de lapins. Cependant de nombreuses contraintes, principalement d'ordre économique, rendent difficiles l'application de ces résultats dans les schémas de sélection cunicole. La sélection génomique n'est pas appliquée en lapins. Sanchez (2024) et Mancin et al. (2021) rapportent des coûts de génotypage relativement élevés pour la filière, de l'ordre de 10 000 à 15 000€ par an dans les scénarios les plus favorables, pour un progrès génétique additionnel faible sur des caractères de production comme la taille de portée (+0,01 nés vivants par génération). Pour des caractères de résistance à la pasteurellose, il faudrait en outre inclure les coûts d'inoculation expérimentale à *Pasteurella multocida* pour assurer un phénotypage régulier de ces caractères.

Tableau 2 : Nombre de SNP significatifs par caractère et par lignée

Caractère ¹	Lignée	Nombre de SNP significatifs	OCU ²	Position (Mb) ³	MAF du SNP dominant ⁴	Effet du SNP dominant ⁵	-LOG10(P-value) du SNP dominant
GMQ-presev	D	19	13	105,7-107,0	0,28	-0,98	6,2
GMQ-PI1	C	12	1	103,6-105,0	0,23	14,07	5,4
GMQ-PI1	F	5	1	171,4-171,6	0,12	14,00	6,6
GMQ-PI1	E	5	2	20,0-20,1	0,27	15,19	5,9
GMQ-PI1	F	2	6	4,2	0,07	20,19	6,1
GMQ-PI1	F	1	11	65,2	0,14	10,87	7,5
GMQ-PI1	A	5	13	48,3 - 48,4	0,08	17,64	5,5
GMQ-PI1	E	1	17	14,3	0,14	16,77	5,7
Abcès	F	1	1	151,9	0,07	-1,03	6,8
Abcès	F	22	1	171,4-175,2	0,07	-1,13	7,0
Bactérie	F	7	4	91,2-91,3	0,21	0,60	5,8
Bactérie	F	2	7	99,3	0,31	0,48	5,7
Résistance	E	11	5	25,6-28,0	0,07	0,92	5,8

¹GMQ-presev=croissance pre-sevrage ; GMQ-PI1=croissance la première semaine après inoculation ; Abcès=note de dissémination des abcès ; Bactérie=note de dissémination de *Pasteurella multocida*; Résistance= note de résistance à la pasteurellose. ²OCU : chromosome du lapin. ³Mb=Mégabase. ⁴MAF= fréquence de l'allèle mineur. ⁵Effet de l'allèle mineur du SNP dominant.

Conclusion

Il existe une composante génétique de la résistance à la pasteurellose chez le lapin. Les régions du génome impliquées semblent être différentes entre lignées.

Remerciements

Le projet a été financé par l'Institut Carnot Santé Animale 2015, par les entreprises de sélection EUROLAP, HYCOLE et HYPHARM, et par le CLIPP.

Références

Aminova, L.R., Luo, S., Bannai, Y., Ho, M., Wilson, B.A., 2008. The C3 domain of *Pasteurella multocida* toxin is the minimal domain responsible for activation of Gq - dependent calcium and mitogenic signaling. *Protein Science* 17, 945–949.

Carneiro, M., Rubin, C.-J., Di Palma, F., Albert, F.W., Alföldi, J., Barrio, A.M., Pielberg, G., Rafati, N., Sayyab, S., Turner-Maier, J., Younis, S., Afonso, S., Aken, B., Alves, J.M., Barrell, D., Bolet, G., Boucher, S., Burbano, H.A., Campos, R., Chang, J.L., Duranthon, V., Fontanesi, L., Garreau, H., Heiman, D., Johnson, J., Mage, R.G., Peng, Z., Queney, G., Rogel-Gaillard, C., Ruffier, M., Searle, S., Villafuerte, R., Xiong, A., Young, S., Forsberg-Nilsson, K., Good, J.M., Lander, E.S., Ferrand, N., Lindblad-Toh, K., Andersson, L., 2014. Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science* 345, 1074–1079.

Gao X, Becker LC, Becker DM, Starmer JD, Province MA. Avoiding the high Bonferroni penalty in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol.* 2010 Jan;34(1):100-5.

IE GenPhySE, INRAE, 2023. Installation expérimentale sur les ovins et les lapins, <https://doi.org/10.17180/ftvh-x393>

Lopez S., Chretien L., Salaün J.M., Wacquez P.A. 2013. Etude

descriptive des mortalités des femelles reproductrices en élevage cynicole. 15èmes J. Rech. Cynicole., Le Mans, 193-196.

Mancin, E., Sosa-Madrid, B.S., Blasco, A., Ibáñez-Escriche, N. Genotype Imputation to Improve the Cost-Efficiency of Genomic Selection in Rabbits. *Animals* 2021, 11, 803.

Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C. 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, 81(3), 559–575.

Sanchez J.P. 2024. Enhancing the sustainability of rabbit production from the perspective of animal genetics. *World Rabbit Sci.*, 33: 1-11.

Shrestha, M., Garreau, H., Balmisse, E., Bed'hom, B., David, I., Guitton, E., Helloin, E., Lenoir, G., Mapuin, M., Robert, R., Lantier, F., Gunia, M. 2019. Projet Relapa (génomique pour la résistance génétique des lapins à la pasteurellose) : paramètres génétiques. 18^{ème} Journées de la Recherche Cynicole, Le Mans, France, 77-80.

Shrestha, M., Garreau, H., Balmisse, E., Bed'hom, B., David, I., Guitton, E., Helloin, E., Lenoir, G., Maupin, M., Robert, R., Lantier, F., & Gunia, M. 2020. Genetic parameters of resistance to pasteurellosis using novel response traits in rabbits. *Genetics Selection Evolution*, 52(1), 34.

Staddon, J.M., Barker, C.J., Murphy, A.C., Chanter, N., Lax, A.J., Michell, R.H., Rozengurt, E., 1991. *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, increases inositol 1,4,5-trisphosphate and mobilizes Ca²⁺ in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 266.

Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T.I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., Lancet, D., 2016. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics* 54. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RCN1>

Zhou X, Stephens M. 2012. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nature Genetics*.44:821–4.