



*A Laurence et Jean-François, mes parents*

*A René et Josseline, mes grands parents*

## REMERCIEMENTS

*Voici le résumé de mes dernières années pour arriver jusqu'ici dans le laboratoire de Génétique fonctionnelle de la Souris.*

*Après mon baccalauréat, j'ai annoncé à mes parents que les études longues n'étaient pas faites pour moi et qu'après mon BTS, j'arrêterai mes études... Il n'y a que les imbéciles qui ne changent pas d'avis et j'en suis le meilleur exemple ! Ce n'est pas sans compter sur les différentes rencontres que j'ai pu faire au cours de mes stages. Le premier fût en 2001 grâce à Etienne Zundel qui m'a fait découvrir le monde de la recherche et qui m'y a fait prendre goût. Deux ans plus tard, Catherine Beaumont me faisait découvrir le monde des QTL dans son laboratoire, le début de mon amour profond pour ce fabuleux monde ... La validation finale fût mon stage avec Francine Krieg et Edwige Quillet qui m'a permis d'entériner cette passion pour la résistance aux maladies infectieuses. Mon destin était trouvé : je voulais développer mes compétences dans l'identification de QTL contrôlant la résistance aux maladies infectieuses !*

*C'est en arrivant en DEA de génétique quantitative que mon regard s'est indéniablement penché sur une offre de stage intitulée : identification de facteurs génétiques contrôlant la résistance à la peste à l'aide de croisements interspécifiques chez la souris ! La perfection : tout ce que je voulais, résumé en quelques mots ...*

*Mes premiers remerciements vont aux membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté leurs différents rôles avec enthousiasme. A Claude Libert et Claude Chevalet, d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, pour leur grande disponibilité et l'œil critique qu'ils ont posé sur ma thèse. A Claire Dane, Elisabeth Carniel et Etienne Verrier d'être examinateur dans mon jury.*

*A tous les membres du laboratoire de génétique fonctionnelle de la souris, je tiens à exprimer ma joie d'avoir été des leurs pendant ces quelques années.*

*Mes plus sincères remerciements vont à Xavier Montagutelli pour m'avoir supportée pendant tout ce temps. Mon caractère souple et mon absence de franc-parler ont certainement été un moment de plaisir pour toi (... ou pas !). Merci à toi pour cet apprentissage de la rigueur statistique, tes discussions autour des résultats plus ou moins cohérents, ton aide à la manipulation des souris, mais aussi au déjeuner chez toi avec toute ta petite famille pour me changer les idées lors de mes week-ends bloqués à Paris pour les manips. Tu as réussi à me faire aimer tes souris préférées les « spretus » qui me manqueront, c'est indéniable ... Un grand merci pour tout Xavier de la part de celle que tu surnommait « cocotte » ou « poulette » (j'espère que tu pérenniseras ce surnom !).*

*Je tiens également à remercier Jean Jacques Panthier de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces quatre années et pour nos discussions autour de notre projet pesteux.*

*Un grand merci à Jean Jaubert pour m'avoir formée à manipuler ces charmantes souris douces et dépourvues d'agressivité ;-)... A ton aide pour les manips au cours de ma thèse et des discussions autour des résultats. Buena suerte para el futuro !!*

*Je n'oublie pas le reste de la dream team, constitué des « Babinet » et des « Guénet » comme nous continuons à les appeler malgré la fusion des deux entités.*

*Mes remerciements vont également à Jean Louis Guénet et Charles Babinet.*

*Jean-Louis, vos fréquentes apparitions dans le laboratoire étaient comme un rayon de soleil. Vous ne pouvez pas passer ici sans accorder du temps à chacun et vous intéresser à nos résultats. Merci beaucoup pour votre écoute, vos conseils et votre gentillesse. Un réel plaisir d'avoir eu la chance de vous connaître ...*

*A vous Charles, qui nous avez quittés trop tôt. Je sais à quel point vous auriez été heureux d'être à ma soutenance et de fêter cela dignement avec nous. Même si les QTL étaient bien loin de vos embryons, vous avez toujours été d'une écoute indéniable. Que de bons moments passés avec vous à refaire le monde autour d'un verre. Je repense au dernier que nous avons pris ensemble pour la fausse obtention de la bourse Roux de Martin, il restera à jamais gravé dans ma mémoire. Une pensée émue pour vous Charles ...*

*Un immense merci à mes colloc' de labo, Tânia et Laurent ! Nous formions le trio gagnant (oui, oui, gagnant !) de la pièce 131 ! Que de moments de rigolades avec vous (mon départ annonce le retour au calme du labo, vos tympanes vont se reposer), ce fût une merveille, je ne pouvais pas rêver mieux !!! Les discussions tous les trois en rond version boudoir à tenter de développer les traductions littérales du vocabulaire que j'enseignais à Tânia. Ces moments passés avec vous me manqueront les zouzous !!! Je vous embrasse fort !*

*Un remerciement tout particulier à zizouille ma fripouille, ma maman de labo. Ton aide lors de l'élaboration de cette thèse, ton écoute, ton soutien pendant ces années ont été fabuleux. J'ai fait chauffé l'eau de ton thé chaque matin et gare à toi si tu avais deux minutes de retard, j'espère que cette tradition perdurera ... Je t'embrasse affectueusement ma Ziza !*

*Un grand merci goût citron vert pour Michel Cohen-Tannoudji ! MichMich, mon fournisseur de café et de cachaça ! Merci pour ton écoute et ton soutien dans des moments parfois difficiles. Tu savais me remonter le moral en me faisant déguster ta meilleure cachaça dans ton bureau (je te dois mes séances hebdomadaires aux AA) ! Malgré nos différences (tu avais un gène mais pas de phénotype et moi un phénotype sans gène !), tu as toujours été de bon conseil pour discuter de mes résultats et trouver la moindre petite faille dans ces derniers !*

*Je tiens à remercier Franck Coumilleau (El chouch') et Teddy Leguillier pour leur présence, leur complicité et leur soutien. El chouch' et ses petits genoux en mousse, le roi de la maxiprep, un grand merci pour ton écoute, et tes conseils pendant la rédaction de cette thèse. Mon Teddynou, ton Maître est très fier de toi. Je compte sur toi pour perpétuer les traditions de ce labo. Un grand merci à vous deux !*

*Mes profonds remerciements vont à Dominique Simon et ses talents culinaires (merci aussi d'avoir recousu tous mes boutons pendant 4 ans), à Myriam Fenina et nos discussions parfois tardives sur le déroulement de nos thèses respectives, à Marie L. et ses petits remontants chocolatés, à Fraisy-Marie le rayon de soleil, à Sarah Beck-Cormier et ses tests culinaires, à Sandrine Vandormael-Pounin et sa rigueur en terme d'hygiène et sécurité, à Camille Haudecoeur ma fabuleuse stagiaire, à Jihane Soueid ma complice de DEA, à Gaëtan Burgio et ses petits crânes, à Céline Gomet et ses virus brillants, à Jérôme Artus notre petit Gus.*

*Je tiens à remercier la Délégation Générale pour l'Armement (DGA) pour le financement de cette thèse et notamment Mmes Christine Couesnon et Claire Dane pour leur disponibilité.*

*Je n'oublie pas les Afloriens, nos collègues des réunions de labo du mercredi matin :*

*Geneviève Aubin-Houzelstein, ma GahGah, que de bons moments passés ensemble. Je te remercie pour ton soutien, ton écoute et ton aide durant toute cette thèse. Tu es juste fabuleuse, ne change rien !! Que de bons souvenirs, de rigolades dans cette pièce bleue à refaire le monde et déclamer les plus beaux noms de lapins (je sais que tu comprendras !) avant de commencer les réunions de labo. Un baiser très affectueux de ta panthère rose pasteurienne ;-)*

*Un grand merci à Johanna, ma Djian, qui fût toujours présentes pour les moments les plus sympathiques (comme les soirées roses ou plumes) mais aussi les périodes difficiles que la vie peut imposer ! Je te souhaite tout le bonheur possible ma Jo, je t'embrasse chaleureusement.*

*Je n'oublie pas Marie Abitbol (notre reine du trial !), Laurent Tiret (Titi et son éternel sourire), Florence Bernex (avec sa douceur et sa joie de vivre incommensurable), Marie Maurer (la S/NPeuse), Pierrick Salaun (notre papy national), Giorgia Egidy (et les meilleurs tiramisus du monde !), Cécile Campagne (et sa pink'attitude !), Fanny Storck (et son sourire permanent). A tous un grand merci les Alforiens*

*Je tiens à remercier les « biotoxéurs ». J'ai eu l'immense opportunité de rentrer dans cette grande famille comme la « petite » que vous avez chacun protégé à votre façon. J'ai eu la chance de faire ma thèse non pas dans un laboratoire mais dans cinq. Vous m'avez tous ouvert les portes de vos bureaux et de vos labos.*

*Tout d'abord, je tiens à remercier le labo des pesteux (officiellement Yersinia !) avec :*

*Elisabeth Carniel, je te remercie sincèrement de ton accueil, de tes attentions particulières, de la confiance que tu m'as accordée en me donnant l'accès à ton P3, à tes laboratoires et aux personnes qui sont chez toi. La porte de ton bureau m'a toujours été ouverte pour discuter sciences ou autres. Je n'oublie pas les moments de détente « caïpirinha » que ce soit dans ton bureau ou au Bréquet ! Tu es une redoutable adversaire pour cette compétition ;-)...*

*Un grand merci pour ton aide très importante lors de la recherche de financement pour ma bourse de thèse.*

*Christian Demeure, le chef d'orchestre de la physiopath. ! Tu m'as toujours accueillie les bras ouverts pour tes diverses manipes macrophages and co. Beaucoup de temps passé ensemble, que ce soit pour la science, pour le café/chouquettes ou la caïpirinha ! Un grand merci pour toutes ces connaissances que j'ai pu acquérir auprès de toi et pour ta gentillesse.*

*Corinne Fayolle, ma coco ! Même si tu m'as fait l'offense de m'abandonner au cours de ma thèse en allant t'occuper de nouveaux petits aux enseignements, il ne me reste pas moins d'excellents souvenirs auprès de toi. Toujours fidèle, toujours de bonne humeur, d'une capacité technique hors du commun. Je n'ai jamais calculé précisément, mais je crois que tu as dû me préparer quelques litres de bouillons pesteux pour nos divertissements du vendredi matin 10h aux agents infectieux !*

*Christelle Huon, ma p'tite Chris, qui a pris le relais suite au départ de Coco ! Toi aussi, toujours fidèle au poste même dans mes manips les plus tordues et les plus longues, tu ne m'as jamais abandonnée dans les couloirs de Duclaux ! Toujours à l'écoute aussi dans les périodes plus ou moins faciles que chacun traverse. Un grand merci pour tout, j'attends maintenant ta pendaison de crémaillère dans ton nouvel appart' ;-)*

*Je n'oublie pas les moments passés avec le reste de l'équipe : Iman (et ses petits gâteaux délicieux !!), Céline (et son perpétuel sourire), Toan (et ses bactéries star trek !), Clémence (et ses cookies), Sofia, Françoise, Anne et Sylvie.*

*Je tiens aussi à remercier le labo des cytoK' (Cytokines et Inflammation, pour la partie officielle !)*

*Jean-Marc Cavaillon, le grand manitou ... Par où commencer pour toi, cher Professeur ... La première fois que nous nous sommes rencontrés, ce fût bien évidemment lors d'une réunion Biotox pendant laquelle j'exposais mes résultats ! Tu m'as traumatisée ... Je ne connaissais pas ton côté « audieux » (je ne rentrerais pas dans le détail de l'orthographe de ce mot qui est bien évidemment faux, je dirais juste private joke!). Il faut apprendre à te connaître pour dévoiler cette gentillesse profonde qui est cachée sous cette carapace. Tu es devenu au cours du temps un confident. Toujours là pour être à l'écoute et avenant pour toutes les choses de la vie qui sont plus ou moins facile à traverser parfois ! Impossible de te mentir pour la moindre des choses, tu lis en moi comme dans un livre ouvert ... ce qui est énervant parfois et tu sais pourquoi ! Tu m'as*

*toujours laissé libre accès à ton laboratoire et tu m'as même donné l'opportunité, je dirais même la chance, de peut être venir parmi vous par la suite, j'espère juste ne pas te décevoir si cela se confirme. Un dernière requête que tu ne peux pas refuser puisque tu n'étais pas là pour ma soutenance, je voudrais que tu m'imites une dernière fois la cellule en pyroptose, tu la fais si bien ;-)*

*Catherine Fitting, ma petite Cathy, une collègue et une amie de la première heure ! Toi aussi une confidente qui a toujours été là pour moi, je ne l'oublierais jamais ! Tu m'as tellement appris, tous les fondamentaux de comment passer d'une souris entière à une souris en kit, comment jouer à Mac Giver pour déboucher pour la Nième fois le lecteur de billes du Bioplex ... tout ça dans un contexte quasi-militaire bien sûr car la rigueur et Cats, ça ne fait qu'un ;-)*  
*Toujours là le matin pour venir prendre un café avec moi en pièce bleue, sans oublier bien évidemment les chouquettes ! Je crois que l'on aura fait tourner toutes les boulangeries du coin avec nos innombrables petits déj' ! Tu sais toute la reconnaissance que j'ai pour toi, je ne m'étendrai pas plus ...*

*Vous avez été Jean-Marc et Cathy, les deux acteurs principaux et officiels de nos biotoxeries, mais ayant passé tellement de temps dans vos murs, j'ai eu la chance de faire de bien belles autres rencontres chez vous, je pense notamment à :*

*Minou Adib-Conquy, qui a toujours été là pour mes petites histoires de TNF récepteur à tenter de me faire comprendre comment marchait cette sublime technique de la qPCR. J'ai eu la chance de connaître surtout ton côté humain, toi aussi toujours là pour une petite pause au RDC bas du CIS pendant la rédaction de ma thèse, les petits messages de soutien le week-end en chat sur facebook.... La vie, c'est comme une boîte de chocolats, on ne sait jamais sur quoi on va tomber ! J'espère que nous dégusterons ensemble nos préférés prochainement ...*

*François Philippart, le super Doc' qui raconte ses histoires de gardes (et pas que de gardes d'ailleurs !) en mangeant son éternel pain de mie, ses raisins secs et ses amandes en guise de déjeuner ! Le roi de la souris pas chère ... Un grand merci pour ta bonne humeur quotidienne et des petites soirées un peu plus arrosées ;-)*

*Je n'oublie bien évidemment pas Ronan, Oh Yoen, Marianna, Nora, Oumaïma, Gaëlle, Noëlle et Véro.*

*Mes profonds remerciements vont à Geneviève Milon, la « maman des pasteurien ». Beaucoup de très bons moments passés avec vous chère Geneviève que ce soit lors de dîners plus ou moins improvisés ou de petits déjeuners scientifiques à 7h pour discuter des derniers résultats. Votre curiosité scientifique n'a échappé à personne mais votre soutien pour les choses les plus personnelles a été très important pendant ce marathon qu'est la thèse. Vous m'en voyez désolée mais contre toute attente, pour vous, le déclic lors de la rédaction n'est malheureusement jamais venu. Un grand merci pour votre disponibilité permanente et votre aide pour l'obtention de cette bourse de thèse qui m'a permis de m'épanouir ces dernières années.*

*Merci à Michel Huerre qui a tenté de m'initier à l'histologie, en m'expliquant ce que j'étais censée voir sur ces coupes avec un succès limité, il faut être honnête.*

*Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de l'animalerie centrale qui s'est toujours occupé merveilleusement bien de mes petites souris. Sans ces personnes, ce projet n'aurait jamais pu en arriver là ! Un grand merci à Isabelle Lanctin (ma lanctinette) pour tous ces moments passés ensemble et pour ton entière disponibilité pour mes éventuelles questions souris sauvages. Merci aussi à Pierre Alcan qui s'est toujours très bien occupé de mes petites souris sauteuses. Je n'oublie pas les autres complices : Yohann & Héléna (vous me manquez les zouzous !), Rachid, Didier, Noël, Michel, Miguel, ...*

*Un grand merci aux membres du COSAC.*

*A Franck Bourgade, mon complice de café pendant ces 4 années. Je suis passée te chercher chaque matin pour un petit café à Metchnikoff avec notre zizouille. Ces moments de complicité, de confiance et de rigolade me*

manqueront. Tu as toute mon affection mon p'tit Boubou, j'en profite pour te rappeler que tu me dois un verre pour avoir piqué tes souris le dimanche soir à 18h, à bon entendeur ;-). Une pensée affectueuse pour Sophie, Quentin, Pauline sans oublier Cannelle ... Je vous embrasse chaleureusement !  
Je tiens également à remercier, Elo (la ch'tiote SNPeuse et la reine du Muffin), Angy (avec son petit caractère si souple et adorable, on dirait le mien), Ludo (et son sourire !).

Mes plus chaleureux remerciements iront à mes complices les plus proches qui m'ont soutenue quotidiennement pendant ces années. Sans vous, je ne sais pas si j'aurais pu atteindre la finalisation de ce travail et poser le « the end » sur cette histoire.

A Marion Doucet, mon grand « ah bon », je ne sais pas où commencer pour toi, tellement de choses à dire ... Ta présence, ton écoute, ton rire gras, nos dîners famille, ont été des étapes cruciales de ces années pasteuriennes. Merci pour toutes tes attentions florales au cours de la rédaction. Que de fabuleux moments passés avec mon amie fidèle. Je t'embrasse très tendrement. Uaiissssssss !

A Martin Houllard, mon complice du labo, beaucoup d'heures passées en pièce bleue à discuter de notre VDM et à tenter de me remonter le moral pendant le marathon de la thèse. Toi aussi, toujours là dans les moments les plus difficiles, mais aussi les plus joyeux ! Que de bons moments chez Eric, au Bréguet, à l'Authentique ou les soirées Z du vendredi chez moi. Je te souhaite bonne chance et bon courage pour la suite, j'espère que tes compétences et tes qualités humaines seront ENFIN considérées à leur juste valeur. Toi aussi, mon ami Martinos les p'tits bras, je t'embrasse très affectueusement.

A Céline Souilho, mon octoc... écossaise, un grand merci pour ton amitié, ton soutien, tes « c'est pas bon » en te frottant les yeux, tous ces moments passés dans la pièce bleue avec moi et ton soutien facebookien quotidien pendant la rédaction. Tu nous as laissé un grand vide lors de ton départ, jamais comblé, tu es irremplaçable. Je suis particulièrement touchée de ta présence pour ma soutenance, un grand merci ma Célinette adorée. Je t'embrasse très affectueusement ma quadric...

A Charles Dauvergne, mon attaché de direction préféré. Nous nous sommes rencontrés beaucoup plus tardivement et surtout pendant la rédaction de ma thèse (la plus mauvaise période imaginable !) mais une complicité indéniable s'est tout de suite établie entre nous. Quand l'administratif rencontre la scientifique, c'est le choc des « cultures » ! J'ai beaucoup apprécié de te faire découvrir « mon » monde et mes petites souris. Je te remercie mon Charly pour ta présence, ton écoute, ta complicité, tes attentions Dauvergniques au quotidien. Tu sais à quel point tu es important pour moi ... J'espère sincèrement que ta phrase fétiche « après la pluie, le beau temps » va s'appliquer bientôt. Je t'embrasse tendrement mon Charly.

A Sandrine Leguillou, Mélanie Gay et Franck Tiquet, mes amis de longues dates. Je vous remercie pour votre soutien et votre écoute durant ce marathon qu'est la thèse. Les week-ends boulonnais resteront à jamais dans nos mémoires je crois, mais interdiction de sortir des clichés de ces moments. Je vous embrasse tous.

Mes derniers remerciements iront à ma famille sans qui je ne serais jamais arrivée jusqu'ici.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix pour arriver jusque là. Cette année 2009 fût une étape très difficile à vivre pour nous tous. J'espère que nous en sortirons rapidement.  
Mon baboune, merci d'être venu à ma soutenance, tu sais à quel point cela était important pour nous. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes ... Je t'embrasse affectueusement.  
Ma maman, je ne pourrais jamais assez te remercier d'être présente à ma soutenance et de ton investissement pour m'offrir une soirée de thèse inoubliable. Tu sais à quel point cela est important pour moi que tu sois là pour ce jour. Je t'embrasse tendrement ma mounette ...

*Un grand merci pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi. Je ne doute en aucun cas de la joie, du bonheur et de la fierté que vous avez pu avoir le jour de ma soutenance. Je suis très heureuse d'avoir partagé cela avec vous ...*

*Une pensée émue à J. et R, qui ont toujours été là pour moi depuis ma plus tendre enfance et qui m'ont inculqué des valeurs que je porte toujours aujourd'hui.*

*J., je sais à quel point tu aurais été heureuse d'être là en ces moments et j'imagine ta fierté mais le destin en a décidé autrement, tu es partie bien trop vite à mon grand malheur.*

*R, tu ne seras pas là lors de ma soutenance, mais toutes mes pensées iront vers toi. Tu sais à quel point tu es important pour moi et ton soutien quotidien dans mes histoires de souris (le nombre de fois où tu m'as proposé un de tes chats pour résoudre mes problèmes de souris ne se compte plus ...) m'a permis d'en arriver là aujourd'hui.*

*Evidemment, je sais qu'avec ma mémoire de poisson rouge, j'oublie certainement beaucoup de personnes, mais toutes savent bien combien elles comptent pour moi et je les remercie de leur présence.*

## Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Apaf1 : Apoptotic peptidase activating factor 1

Arhgdib : Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Bag4 : BCL2-associated athanogene 4

BC : Backcross

BCG : Bacille Calmette Guérin

Bcl2 : B-cell leukaemia/lymphoma 2

Bid : BH3 interacting domain death agonist

BSB : [(C57BL/6J x SEG/Pas)F1 x C57BL/6J]BC

BSS : [(C57BL/6J x SEG/Pas)F1 x SEG/Pas]BC

Cad : Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase

Casp : Caspase

CC : Collaborative Cross

CCL : Chemokine (C-C motif) ligand

CD : Cluster of differentiation

Cflar : CASP8 and FADD-like apoptosis regulator

Char : *Plasmodium chabaudi* malaria resistance

Chuk : conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase

cM : CentiMorgan

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNG : Centre National de Génotypage

Cradd : CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain (=RAIDD)

CSS : Chromosome Substitution Strains

CTC : Complex Trait Consortium

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand

Cyts : Cytochrome c, somatic

DD : Death Domain

Dffa : DNA fragmentation factor, alpha subunit

DL50 : Dose létale 50  
DMBA : 7,12-dimethylbenzanthracene  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ENU : Ethyl-nitro-urée  
ES cell : Embryonic Stem cell  
EUCIB : European Collaborative Interspecific Backcross  
Fadd : Fas (Tnfrsf6)-associated via death domain  
Fas : Fas (TNF receptor superfamily member 6)  
GRO/KC : Growth-related oncogene/keratinocyte-derived chemokine  
HAM : Haplotype Association Mapping  
Hb : Hémoglobine  
HIV : Human Immuno-deficiency Virus  
HMS : Hemine storage  
HPI : Îlot de haute pathogénicité  
IBD : Identity By Descent  
iE-DAP : Acide-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelic  
IFN : Interferon  
Ig : Immunoglobuline  
Ikbk : Inhibitor of kappa B kinase  
IL : Interleukine  
Inl : Internaline  
IRCS : Interspecific Recombinant Congenic Strains  
Ity : Immunity to *Salmonella Typhimurium*  
Jun : Jun oncogene  
KI : Knock-in  
Klr : Killer Cell Lectin-like receptor  
KO : Knock-out  
LeTx : Lethal toxin  
Lmn : Lamin  
Lmr : Leishmania major response  
LOD : Likelihood of odds  
LPS : Lipopolysaccharide  
Ltb : Lymphotoxin B  
Ltxs : Lethal factor toxin susceptibility

Map3k1 : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
Mb : Mégabase  
MCMV : Mouse cytomegalovirus  
MCP-1 : Monocyte-Chemoattractant Protein  
MIP1 $\alpha$  : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha  
MEF : Mouse embryonic fibroblast  
MGI : Mouse Genome Informatics  
Mit : Massachusetts Institut of Technology  
Mpl : Montpellier  
Mx1 : Mycovirus resistente 1  
Nalp : Nacht domain-, leucine-rich repeat-, and PYD-containing protein  
Ncf2 : Neutrophil cytosolic factor 2  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor  $\kappa$ B  
Ngfr : Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)  
NK : Natural killer  
NLR : NOD like receptor  
NOD : Nucleotide-binding oligomerization domain containing  
NRAMP : Natural resistance-associated macrophage protein  
Oasl2 : 2'-5' oligoadenylate synthetase like 2  
Pb : Paire de bases  
p.i. : Post-inoculation  
Pak1&2 : p21 protein (cdc42/Rac)-activated kinase 1&2  
Parp1 : Poly(ADP-ribose) polymerase family, member 1  
Pas : Pasteur  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
Pglyrp : Peptidoglycan recognition protein  
PMN : Polymorphonucléaire  
Prl : Plague resistance locus  
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction  
QTL : Quantitative Trait Locus  
Rb1 : Retinoblastoma 1  
RCS : Recombinant Congenic Strains  
RIS : Recombinant Inbred Strains

RSV : Respiratory syncytial virus  
RVF : Rift Valley Fever  
Sdf1 : Stromal cell-derived factor 1  
SEB : *Spretus* Espagne Barcelone  
SEG : *Spretus* Espagne Grenade  
SFM : *Spretus* France Montpellier  
Slc11a1 : Solute carrier family 11 member 1  
Sle : Systemic lupus erythmatosus susceptibility  
SMZ : *Spretus* Maroc Azemnour  
SNP : Single Nucléotide Polymorphism  
Sst : Susceptibility to tuberculosis  
STF : *Spretus* Tunisie Fondouk  
TANK : TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator  
Tbs : Tuberculosis severity  
Tg : Transgénique  
Tlr : Toll Like Receptor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
Tnfaip : TNF alpha-induced protein  
Tnfrsf : Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family  
Tnfsf : Tumor Necrosis Factor Super Family  
TRAF : TNF-receptor associated factor  
Trl : Tuberculosis resistance locus  
Ufc : Unité formant colonies  
Vnn : Vanin  
WNV : West Nile Virus

# RESUME

## Résumé et mots clés

La peste est une zoonose touchant principalement les rongeurs et de façon accidentelle l'Homme. L'agent responsable de la peste bubonique et pulmonaire est la bactérie Gram négative *Yersinia pestis*. Les mécanismes qui permettent à l'hôte de résister ou non à cette infection sont mal connus. Nous avons montré que certaines lignées consanguines de souris, comme C57BL/6J, meurent après l'injection sous cutanée de 100 bactéries d'une souche virulente (CO92) alors que d'autres, comme SEG/Pas, dérivée de *Mus spretus*, résistent. Un croisement en retour entre ces deux lignées a permis d'identifier, sur les chromosomes 3, 4 et 6, trois QTLs contrôlant le taux de survie. Les deux premiers ont été retrouvés uniquement chez les femelles alors que celui du chromosome 6 est commun aux deux sexes. Des souris congéniques portant le chromosome 6 de SEG dans un fonds génétique C57BL/6J ont été produites. Après infection, elles meurent dans les mêmes proportions que les souris C57BL/6, mais un peu plus tardivement. Des souris bi- et tri-congéniques sont en cours de production pour tester l'effet des autres QTLs.

Nous avons testé une collection de 55 lignées recombinantes congéniques interspécifiques entre SEG/Pas et C57BL/6J. Plusieurs lignées ont montré des différences de taux ou de durée de survie significatives par rapport à C57BL/6J. L'étude de la lignée 120G, qui meurt plus rapidement que C57BL/6J, suggère que la région proximale du chromosome 6 serait responsable de ce phénotype.

Nous avons ainsi montré que le contrôle génétique de la résistance à la peste chez les souris SEG/Pas est complexe, et identifié plusieurs régions génomiques qui jouent un rôle important dans ce phénotype.

Mots clés : *Yersinia pestis*, peste, souris, résistance, *Mus spretus*

Plague is a zoonotic disease affecting mainly rodents and accidentally humans. The etiologic agent of bubonic and pneumonic plague is the Gram-negative bacterium *Yersinia pestis*. The mechanisms by which the host is able or not to resist the infection are poorly understood. We have shown that some mouse inbred strains, like C57BL/6J, die after the subcutaneous injection of 100 bacteria of a virulent strain (CO92), while others, like SEG/Pas, derived from *Mus spretus*, survive. A backcross between these two strains led to identification, on chromosomes 3, 4, and 6, of three QTL controlling survival rate. The first two were found only in females, while the chromosome 6 QTL was also found in males. Congenic mice carrying the SEG chromosome 6 in a C57BL/6J background were produced. After infection, they die in the same proportion as C57BL/6, but somewhat later. Bi- and tri-congenic strains are under production to assess the effect of other QTLs.

We have tested a collection of 55 interspecific recombinant congenic strains between C57BL/6J and SEG/Pas. Several strains significantly differed from C57BL/6 in survival rate or time to death. The analysis of strain 120G, which dies earlier than C57BL/6J, suggests that the proximal region of chromosome 6 would be responsible for this phenotype.

Altogether, our data show that genetic control of resistance to plague in SEG/Pas mice is complex, and we have identified several genomic regions which play an important role in this phenotype.

Key words : *Yersinia pestis*, plague, mice, resistance, *Mus spretus*

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>Résumé et mots clés.....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>- 12 -</b>
1.1. Recherche de gènes de vulnérabilité aux maladies infectieuses affectant l'Homme.....	- 12 -
1.2. Contribution des modèles animaux à l'étude des maladies infectieuses.....	- 14 -
1.2.1. Modélisation chez l'animal de maladies infectieuses de l'Homme.....	- 14 -
1.2.2. Déroulement des processus infectieux .....	- 16 -
1.2.3. Phénotypes utilisés pour caractériser un processus infectieux .....	- 17 -
1.2.3.1. Nature des caractères .....	- 17 -
1.2.3.2. Mort ou survie.....	- 18 -
1.2.3.3. Courbe de poids .....	- 19 -
1.2.3.4. Evaluation de la prolifération/dissémination de l'agent infectieux.....	- 19 -
1.2.3.5. Suivi des réponses inflammatoires et immunes .....	- 20 -
1.2.3.6. Lésions histologiques.....	- 20 -
1.2.4. Identification de gènes responsables des phénotypes analysés .....	- 21 -
1.2.4.1. Variabilité des caractères .....	- 21 -
1.2.4.2. Notion de QTL.....	- 22 -
1.2.4.3. Localisation génétique des QTL : principes généraux .....	- 23 -
1.2.4.3.1. Marqueurs moléculaires .....	- 23 -
1.2.4.3.2. Localisation des QTL .....	- 24 -
1.2.4.3.3. Cartographie par intervalle .....	- 25 -
1.2.4.3.4. Traitement statistique des résultats.....	- 26 -
1.2.4.3.5. Force d'un QTL.....	- 27 -
1.2.4.4. Les outils génétiques disponibles chez la souris pour la recherche de QTL.....	- 27 -
1.2.4.4.1. Croisements en deux générations .....	- 28 -
1.2.4.4.2. Lignées recombinantes consanguines.....	- 30 -
1.2.4.4.3. Lignées recombinantes congéniques .....	- 32 -
1.2.4.4.4. Lignées consomiques (ou chromosome substitution strains) .....	- 34 -
1.2.4.4.5. Cartographie d'association .....	- 35 -
1.2.4.4.6. Collaborative cross .....	- 35 -
1.2.5. Lignées congéniques et sous congéniques .....	- 36 -
1.2.6. Passer d'une région chromosomique à un gène.....	- 39 -
1.2.6.1. Analyses de gènes candidats.....	- 44 -
1.2.6.2. Production de nouvelles mutations aléatoires .....	- 45 -
1.2.7. Apport de l'étude de modèles animaux pour les maladies infectieuses de l'Homme.....	- 46 -
1.3. Les souris sauvages.....	- 47 -
1.3.1. Origine et évolution du genre <i>Mus</i> .....	- 47 -
1.3.2. Les lignées de souris de laboratoire.....	- 48 -
1.3.2.1. Origine des souris de laboratoire .....	- 48 -
1.3.2.2. Composition génétique des lignées de souris de laboratoire.....	- 49 -
1.3.3. Intérêt des souris sauvages .....	- 49 -
1.3.4. Limites des souris sauvages .....	- 52 -
1.4. La peste.....	- 53 -
1.4.1. Infection par <i>Yersinia pestis</i> .....	- 53 -
1.4.2. <i>Yersinia pestis</i> : la bactérie .....	- 54 -
1.4.3. Epidémiologie .....	- 57 -
1.4.3.1. Les grandes épidémies de peste au cours de l'histoire.....	- 57 -
1.4.3.2. Répartition des cas de peste aujourd'hui .....	- 58 -
1.4.4. Diagnostic .....	- 59 -
1.4.4.1. Diagnostic bactériologique .....	- 59 -
1.4.4.2. Immunochromatographie en bandelettes .....	- 59 -

1.4.4.3.	PCR.....	- 60 -
1.4.5.	Traitement de la peste .....	- 60 -
1.4.5.1.	Traitements et prophylaxies médicamenteux.....	- 60 -
1.4.5.2.	Vaccination .....	- 60 -
1.4.5.3.	Apparition de résistances aux antibiotiques.....	- 61 -
1.4.6.	Bioterrorisme.....	- 61 -
1.4.7.	Modèles animaux de la peste.....	- 61 -
1.4.7.1.	Modélisation de l'infection par <i>Yersinia pestis</i> .....	- 61 -
1.4.7.2.	Etude des mécanismes immunologiques de réponse à l'infection par <i>Y. pestis</i> .....	- 63 -
1.4.7.3.	Etude de l'expression des gènes chez la bactérie et chez l'hôte .....	- 64 -
1.4.7.4.	Identification de facteurs génétiques contrôlant la vulnérabilité de l'hôte à l'infection .....	- 64 -
1.5.	<i>Objectifs du travail de thèse</i> .....	- 65 -
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>- 67 -</b>
2.1.	<i>Génotypage</i> .....	- 67 -
2.2.	<i>Animaux</i> .....	- 68 -
2.3.	<i>Température</i> .....	- 68 -
2.4.	<i>Bactériémie</i> .....	- 68 -
2.5.	<i>Prélèvement de macrophages et culture cellulaire</i> .....	- 68 -
2.6.	<i>Dosage de l'IL-6 par ELISA</i> .....	- 69 -
2.7.	<i>Extraction des ARNm et RT-PCR</i> .....	- 69 -
2.8.	<i>Analyse statistique</i> .....	- 69 -
<b>3.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>- 71 -</b>
3.1.	<i>Introduction</i> .....	- 71 -
3.2.	<i>Influence de plusieurs facteurs sur la réponse des souris infectées par <i>Y. pestis</i></i> .....	- 71 -
3.2.1.	Effet de la dose infectieuse.....	- 71 -
3.2.2.	Influence du sexe et de l'âge des souris .....	- 72 -
3.2.3.	Variabilité entre expériences .....	- 73 -
3.2.4.	Origine des animaux utilisés .....	- 73 -
3.2.5.	Souche bactérienne.....	- 73 -
3.2.6.	Paramètres expérimentaux retenus .....	- 74 -
3.3.	<i>Article</i> .....	- 75 -
3.4.	<i>Recherche d'autres lignées sensibles ou résistantes à l'infection par <i>Y. pestis</i></i> .....	- 100 -
3.5.	<i>Recherche de QTL dans des croisements interspécifiques</i> .....	- 101 -
3.5.1.	Croisement (C57BL/6 x SEG)F1 x C57BL/6 .....	- 101 -
3.5.1.1.	Résumé des résultats présentés dans l'article .....	- 101 -
3.5.1.2.	Analyses complémentaires .....	- 101 -
3.5.2.	Croisement (C57BL/6 x SEG)F1 x SEG .....	- 102 -
3.6.	<i>Analyse de la lignée consomique partielle BcG6</i> .....	- 102 -
3.7.	<i>Production et analyse de lignées congéniques pour <i>Ypr11, 2 et 3</i></i> .....	- 103 -
3.8.	<i>Recherche de sous-phénotypes pour quantifier le degré de résistance</i> .....	- 105 -
3.9.	<i>Etude du gène candidat <i>Tnfrsf1a</i></i> .....	- 106 -
3.9.1.	Recherche de mutation dans la séquence de <i>Tnfrsf1a</i> .....	- 107 -
3.9.2.	Analyse du phénotype des souris <i>Tnfrsf1a<sup>-/-</sup></i> .....	- 108 -
3.9.3.	Analyse fonctionnelle <i>in vitro</i> des deux mutations du DD.....	- 108 -
3.10.	<i>Recherche de QTL à l'aide de lignées recombinantes congéniques interspécifiques</i> .....	- 111 -
3.10.1.	Construction et composition des lignées IRCS.....	- 111 -
3.10.2.	Analyse de la sensibilité des lignées IRCS à <i>Y. pestis</i> .....	- 111 -
3.10.3.	Recherche des gènes impliqués dans la vulnérabilité de la lignée 120G.....	- 113 -

<b>4. Discussion générale.....</b>	<b>- 115 -</b>
4.1. <i>Résistance de la lignée SEG/Pas à la peste.</i> .....	- 115 -
4.2. <i>Phénotype des autres lignées testées.....</i>	- 117 -
4.3. <i>Identification de trois QTL à effet additif et spécifiques de sexe.....</i>	- 118 -
4.4. <i>Caractérisation préliminaire de lignées consomique et congéniques.....</i>	- 120 -
4.5. <i>Caractérisation de mutations dans le gène <i>Tnfrsf1a</i>.....</i>	- 122 -
4.6. <i>Gènes candidats dans les intervalles de confiance des QTL.....</i>	- 124 -
4.7. <i>Contribution des IRCS dans l'identification de gènes de résistance.....</i>	- 127 -
4.8. <i>Directions futures.....</i>	- 129 -
4.8.1. <i>Modèle de résistance à la peste .....</i>	- 129 -
4.8.2. <i>Caractérisation génétique des locus <i>Ypr1</i>, 2 et 3 à l'aide des lignées congéniques.....</i>	- 130 -
4.8.3. <i>Recherche d'autres facteurs génétiques de résistance chez SEG/Pas .....</i>	- 131 -
4.8.4. <i>Sous-phénotypes et caractérisation physiopathologique .....</i>	- 131 -
4.8.5. <i>Etudes d'expression .....</i>	- 131 -
4.8.6. <i>Etudes d'association .....</i>	- 132 -
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>- 135 -</b>

# INTRODUCTION

Après plus d'un siècle de microbiologie moderne qui a conduit à la mise au point et la large diffusion des vaccins, à la découverte des antibiotiques et, plus récemment, de molécules antivirales ou antiparasitaires, le constat montre que beaucoup reste encore à faire pour faire reculer les maladies infectieuses. Parallèlement à une meilleure connaissance des agents infectieux et à l'étude approfondie des réponses immunes innées et acquises mises en jeu lors d'une infection, se développe une recherche qui s'intéresse aux interactions entre l'agent et son ou ses hôtes car l'issue de l'infection est bien le résultat d'une confrontation entre au moins deux organismes vivants.

L'un des aspects de cette recherche exploite les observations souvent anciennes et récurrentes que, lors d'une épidémie, tous les individus exposés à un même agent infectieux ne développent pas un processus pathologique avec la même gravité.

Il semble donc qu'il existe des différences génétiques entre individus d'une même espèce qui sont capable d'influencer l'apparition ou le décours d'un processus infectieux. Des différences de vulnérabilité à une maladie infectieuse peuvent également résulter d'un état physiologique différent : âge, stress, grossesse ou gestation, fatigue, diabète, etc. Cette « voie d'abord » des maladies infectieuses est intéressante à plusieurs titres. Tout premièrement, elle repose sur des différences observées naturellement qui ont une pertinence biologique. Deuxièmement, l'identification de gènes capables de conférer un certain niveau de résistance pointe vers des voies métaboliques, de signalisation ou de régulation qui sont autant de cibles thérapeutiques éventuelles dont l'efficacité est déjà validée. Enfin, les mécanismes identifiés sont souvent partagés entre espèces, ce qui justifie et valide le recours à des modèles animaux soigneusement choisis pour étudier les maladies infectieuses.

En ce qui concerne les maladies infectieuses affectant l'Homme, plusieurs gènes ont été identifiés directement dans cette espèce tandis que d'autres l'ont été sur la base de travaux menés dans des espèces modèles, principalement la souris. Les recherches menées directement chez l'Homme sont compliquées par la difficulté d'évaluer précisément le niveau de vulnérabilité de chaque individu. On ne connaît jamais la dose infectieuse reçue, rarement la date et le site d'infection, et des facteurs nombreux tels que l'hygiène, l'alimentation, l'état physiologique ou la mise en œuvre de traitements à visée thérapeutique, varient entre individus et entre groupes, ce qui perturbe l'analyse du niveau de résistance conféré par le génotype de l'hôte.

L'étude de modèles animaux, dans lesquels tous ces facteurs peuvent être contrôlés et standardisés avec précision, se présente alors comme une alternative intéressante, en particulier pour des infections auxquelles l'espèce choisie est naturellement sensible.

C'est le cas pour la peste qui a fait l'objet de notre travail. Cette maladie qui est provoquée par l'entérobactérie *Yersinia pestis* a marqué de façon effrayante plusieurs époques de l'histoire humaine par des épidémies extrêmement meurtrières. Ainsi, la grande Peste Noire qui a sévi entre 1334 et 1351 a tué 40% de la population européenne et plus de la moitié des habitants des grandes villes comme Paris ou Hambourg. En raison de l'ampleur de ces épidémies, il est probable que la plupart des personnes ont été infectées, mais qu'une proportion d'entre elles a survécu, suggérant l'existence de facteurs génétiques de vulnérabilité à la peste.

*Yersinia pestis* infecte naturellement de nombreuses espèces de rongeurs, dont la souris. Cependant toutes les lignées de souris ne présentent pas le même niveau de vulnérabilité. Notre laboratoire a montré qu'alors que la plupart des lignées de souris sont sensibles à une infection par la souche virulente CO92 de *Yersinia pestis*, la lignée SEG/Pas de l'espèce *Mus spretus* présente un niveau de résistance remarquable. Au cours de ma thèse, j'ai voulu caractériser les différences physiopathologiques capables d'expliquer cette différence de vulnérabilité. Par ailleurs, j'ai entrepris l'identification de régions du génome qui contrôlent cette différence, en utilisant des croisements interspécifiques de deux types. Si l'identification des gènes eux-mêmes reste un objectif encore lointain, j'ai montré que le contrôle génétique est complexe, mettant en jeu au moins trois gènes. Les outils que nous possédons chez la souris seront précieux pour étudier l'effet de ces gènes dans des conditions expérimentales parfaitement contrôlées et apporteront des précisions sur les mécanismes de cette maladie dont la plupart restent obscurs.

## **1. Introduction**

### *1.1. Recherche de gènes de vulnérabilité aux maladies infectieuses affectant l'Homme*

Pour Charles Darwin, les maladies étaient l'un des facteurs déterminants pour la survie relative des espèces. Selon Haldane, la sélection des individus par les maladies infectieuses modifiait la fréquence des allèles aux gènes impliqués dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Ces concepts sont généralement acceptés aujourd'hui et font l'objet de recherches importantes pour identifier les facteurs génétiques impliqués chez l'Homme. Il existe des différences majeures de vulnérabilité à des agents pathogènes entre les populations, qui sont souvent associées à la présence ou non de l'agent dans les différentes régions. Il est facile d'imaginer qu'un allèle portant une plus grande résistance à un agent infectieux soit sélectionné dans une population exposée à cet agent. Le cas du paludisme, causé par le parasite *Plasmodium falciparum*, est un exemple classique (Miller *et al.*, 1994). Dans les régions où la maladie sévit de façon endémique, certains individus sont plus résistants que d'autres aux formes les plus graves du paludisme. Il est apparu que cette résistance partielle était souvent associée au génotype hétérozygote pour un allèle muté de la  $\beta$ -globuline appelé HbS, responsable d'une maladie génétique grave, appelée anémie falciforme. A l'état homozygote, elle provoque une anémie grave en raison d'une anomalie de structure des érythrocytes. Ainsi, il existe un équilibre entre la sélection contre l'allèle HbS en raison de l'anémie et la sélection en faveur de cet allèle en raison de la résistance partielle au paludisme qu'il confère. Cet équilibre explique la fréquence relative élevée dans les régions africaines atteintes de paludisme, contrairement aux régions qui en sont exemptes.

Les analyses génétiques de maladies multifactorielles résultant des effets et interactions entre de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, ont conduit à mettre en évidence des régions du génome pouvant contenir des gènes de vulnérabilité aux maladies infectieuses.

L'analyse de liaison est basée sur l'utilisation de génotypes et de phénotypes provenant de multiples familles sur plusieurs générations. L'objectif est d'identifier des régions chromosomiques préférentiellement héritées par les descendants présentant un phénotype donné. L'analyse de liaison repose sur le fait que, comme le gène causal ségrége au sein de personnes apparentées, les marqueurs proches de ce gène co-ségrégent avec lui. Cette approche est très puissante mais n'est pas facilement applicable dans le cadre des maladies infectieuses car elle impose qu'au sein de personnes apparentées un nombre suffisant de personnes soient atteintes et

non atteintes. De plus, si cette approche se révèle très efficace dans le cas de caractères contrôlés par une seule région chromosomique, elle l'est moins lorsque le caractère est multigénique.

Les études d'association comprennent l'utilisation de familles et des études cas/témoins. Elles peuvent être utilisées pour étudier l'ensemble du génome, faire de la localisation fine ou travailler sur un gène précis identifié au préalable chez l'Homme ou par des modèles animaux comme la souris (des exemples de gènes au préalable identifiés chez la souris seront développés dans la partie 1.2.7.1).

Par exemple, les populations indiennes sont particulièrement exposées à la lèpre tuberculoïde. Des études de liaison sur l'ensemble du génome faites sur une population Indienne habitant au Royaume Uni et comprenant plus de 200 personnes ont permis de mettre en évidence deux régions chromosomiques liées à ce caractère sur les chromosomes 10p13 et 20p12 (Siddiqui *et al.*, 2001; Tosh *et al.*, 2002). Une cartographie fine et des études d'association au sein de familles ont permis de mettre en évidence une mutation dans l'exon 7 du *Macrophage mannose receptor*. Trois changements d'acides aminés sont associés à la résistance à la lèpre tuberculoïde. Il a été ensuite montré que cette mutation était plus fréquemment retrouvée dans les populations Européenne et Asiatique qu'Africaine (revue par (Hill, 2006)). Une étude sur une population Vietnamiennne a révélé une liaison forte avec un locus du chromosome 10p13 et avec un autre locus sur le chromosome 6q25 (Mira *et al.*, 2004). Une étude d'association dans les populations Vietnamiennne et Brésiliennes a montré une association à une mutation située dans le promoteur du gène *Park2*. Cette mutation n'a pas été retrouvée dans la population Indienne (Malhotra *et al.*, 2006).

Ainsi, les facteurs génétiques impliqués dans les populations soumises à une pression de sélection par un pathogène peuvent différer en fonction de la localisation géographique et des formes de la maladie.

L'analyse de cas familiaux de vulnérabilité très sévère à des maladies infectieuses a été exploitée pour identifier des gènes qui jouent un rôle majeur dans la réponse aux infections. En raison de la force de leurs effets, ces mutations se comportent généralement comme des caractères mendéliens. Ainsi, dans certains cas, heureusement très rares, des enfants développent des maladies cliniquement très sévères à la suite d'une injection de BCG, le bacille de Calmette et Guérin, souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, ou d'une infection par des mycobactéries de l'environnement. Le groupe de J.L. Casanova et L. Abel, à l'hôpital Necker, ainsi que d'autres équipes, ont étudié l'étiologie génétique de ces syndromes dont le mode de transmission apparaît

clairement mendélien (pour une revue, voir Fortin et coll., 2007)(Fortin *et al.*, 2007). Ils ont ainsi identifié, dans différentes familles, des mutations dans plusieurs gènes impliqués dans les relations entre macrophages ou cellules dendritiques et lymphocytes T ou cellules NK (Natural Killer) : récepteurs 1 et 2 à l'interféron  $\gamma$ , IL-12p40 et son récepteur  $\beta 1$ , STAT-1 et NEMO (Altare *et al.*, 1998; Altare *et al.*, 1998; Chagnier *et al.*, 2006; Filipe-Santos *et al.*, 2006; Jouanguy *et al.*, 1999; Vogt *et al.*, 2005)

## 1.2. Contribution des modèles animaux à l'étude des maladies infectieuses

### 1.2.1. Modélisation chez l'animal de maladies infectieuses de l'Homme

Les modèles animaux sont très utilisés pour l'étude des maladies infectieuses de l'Homme. Les études génétiques de prédisposition aux maladies infectieuses sont difficiles à entreprendre directement chez l'Homme pour diverses raisons : les infections ne sont pas contrôlées (en terme de dose inoculée, de pureté de la souche, etc...), les facteurs environnementaux sont très différents d'une personne à l'autre (alimentation, hygiène, exposition aux vecteurs, etc.), peu de phénotypes sont analysables et surtout la mise en œuvre de traitements dirigés contre l'agent infectieux perturbe l'évolution naturelle de la maladie. L'ensemble de ces facteurs de variations peut être contrôlé chez des animaux de laboratoire

Il est toutefois important de prendre en compte la pertinence du modèle utilisé. Pour certaines infections, l'animal de laboratoire est un hôte naturel comme dans le cas de la peste avec les rongeurs. En fonction du pathogène, ces différents modèles ne sont pas des hôtes naturels mais développent des maladies plus ou moins proches de celles de l'Homme aussi bien au niveau de la pathogénèse (tissus et types cellulaires touchés, progression des lésions développées) que de la réponse physiologique (inflammation, immunité, etc.).

Par exemple, les modèles animaux les plus utilisés pour l'étude de la tuberculose sont la souris, le lapin et le cobaye. Ces trois modèles montrent une vulnérabilité très différente face à cette maladie : les souris sont relativement résistantes (plus ou moins en fonction des lignées utilisées) contrairement aux lapins et aux cobayes qui sont très sensibles. Les études faites sur ces trois modèles sont par conséquent complémentaires les unes des autres et ont permis de mieux comprendre l'immunopathogénicité de la tuberculose, les facteurs génétiques contrôlant l'infection, l'efficacité des traitements antimicrobiens et les interactions hôtes/pathogènes. Les souris sont particulièrement utilisées pour étudier la réponse immunitaire et notamment le déterminisme génétique de la vulnérabilité de l'hôte à l'infection, mais aussi pour tester des

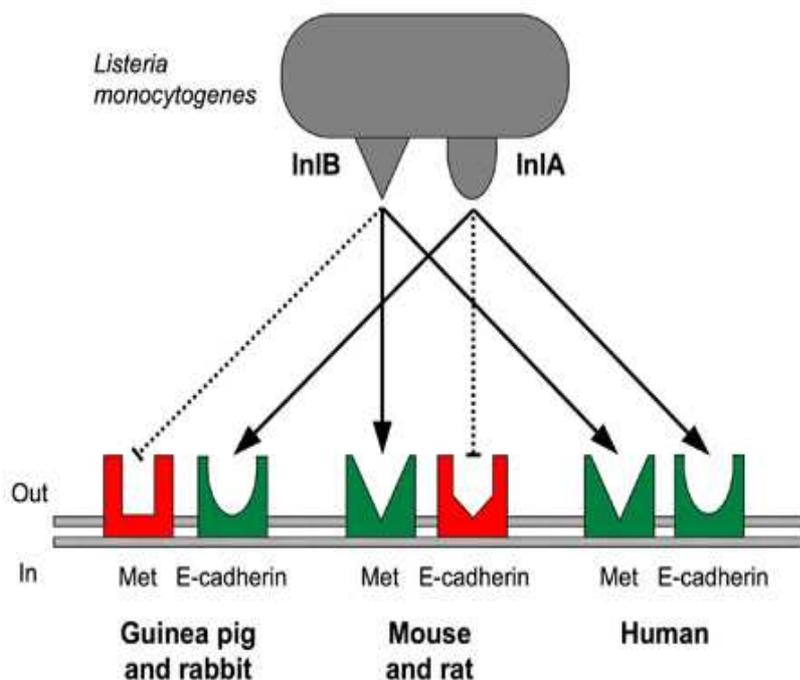
médicaments antibactériens. Le lapin développe une forme pulmonaire contrairement aux deux autres modèles et est donc un modèle de choix pour étudier cette forme de la maladie. Les cobayes, très sensibles à ce pathogène, sont très utilisés pour étudier le mode de transmission par aérosol de la bactérie mais aussi pour tester des vaccins.

Dans le cas où certaines espèces animales ne développent pas naturellement la maladie, il est possible d'introduire un gène humain pour rendre l'espèce sensible. C'est par exemple le cas de *Listeria monocytogenes* et du virus polio.

*L. monocytogenes* possède deux protéines de surface appelées internaline A et internaline B (notées respectivement, Inl A et Inl B). Ces protéines jouent un rôle important dans l'internalisation de la bactérie au sein des cellules. Elles sont reconnues par des récepteurs membranaires de la cellule hôte. L'internaline A est reconnue par l'E-cadhérine tandis que l'internaline B est reconnue par le récepteur Met de façon spécifique. Il existe une spécificité d'espèce très importante entre l'E-cadhérine et l'InlA (cf. figure 1). En effet, alors que l'E-cadhérine humaine reconnaît parfaitement l'InlA de la bactérie, l'E-cadhérine murine en est incapable (Lecuit *et al.*, 1999). Pour cette raison, la souris est un mauvais modèle pour l'étude de *L. monocytogenes*. Disson *et coll.* (2008) ont entrepris « d'humaniser » le modèle murin afin d'étudier l'invasivité de la bactérie chez son hôte (Disson *et al.*, 2008). Pour cela, une souris Knock-In (ou KI) a été produite pour introduire le gène de l'E-cadhérine humaine dans le génome murin. Ainsi, les souris produites reconnaissent l'InlA et miment une réponse extrêmement proche de celle de l'Homme.

Il en est de même pour le poliovirus. Des souris transgéniques portant un gène codant le récepteur humain du virus de la polio ont été créées dans le but d'étudier les mécanismes moléculaires de la pathogenèse du virus. Ces souris ont l'avantage de pouvoir mimer la maladie observée chez l'homme et chez les primates. Elles permettent de comprendre la physiopathologie mais aussi de tester d'éventuels vaccins. Elles ont permis de limiter les études faites auparavant sur des primates (Nomura, 1997).

Ces différents modèles sont utilisés pour l'identification de gènes de vulnérabilité aux maladies infectieuses en émettant l'hypothèse que les mécanismes sont conservés entre les espèces.



**Figure 1 : Reconnaissance des internalines A et B de *L. monocytogenes* par les récepteurs Met et E-cadherine chez le lapin, le cobaye, la souris, le rat et l'Homme.**

Chez l'homme, les protéines de surface de la bactérie InlA et InlB peuvent se lier à leurs récepteurs respectifs, la E-cadhérine et Met, induisant l'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules épithéliales humaines. Chez la souris et le rat, la substitution d'un seul acide aminé de la E-cadhérine en position 16 inhibe la liaison d'InlA à ce récepteur. Chez le cobaye et le lapin, InlB ne peut ni reconnaître ni activer le récepteur Met par un mécanisme qui reste à déterminer (Hamon et al., 2006).

### 1.2.2. Déroulement des processus infectieux

Comme c'est le cas pour toute maladie, la recherche de gènes de sensibilité/résistance aux maladies infectieuses impose d'étudier des phénotypes précis afin de les relier au génotype. Dans le cas des maladies infectieuses, le processus inflammatoire se décline en plusieurs étapes qui aboutissent soit à la guérison, soit à la mort de l'individu, soit à des inflammations chroniques.

Les mécanismes physiopathologiques mis en place lors de l'infection sont très différents d'une maladie à l'autre et donc absolument pas généralisables. Pour illustrer cette variabilité, nous allons nous intéresser à 3 exemples : une infection bactérienne (Tuberculose), virale (la fièvre de la vallée du Rift) et parasitaire (la maladie de Chagas).

La tuberculose est causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* qui est transmise, dans la majorité des cas, par voie aérienne. Des particules contenant le bacille tuberculeux sont produites lors de la toux et pénètrent chez l'individu contaminé jusqu'aux alvéoles pulmonaires. La pénétration du bacille dans l'organisme ne conduit à la maladie que dans 10% des cas en moyenne. Dans 90% des cas, la multiplication des bacilles s'arrête rapidement (Knechel, 2009). Les bacilles se multiplient dans les macrophages alvéolaires et déterminent la formation d'un chancre d'inoculation au niveau des lobes. La dissémination dans l'organisme se fait d'abord par voie lymphatique et ganglionnaire puis sanguine avec des localisations secondaires, dont la plus importante au niveau pulmonaire se situe à l'apex. La progression de la maladie est très lente. Le patient peut également développer une tuberculose extra-pulmonaire pouvant atteindre le rein, les os et les articulations (ostéo-arthrites, infections invalidantes), l'appareil digestif, le cerveau et la moelle épinière (méningites, infections très graves), ou bien tout le corps (tuberculose miliaire).

La fièvre de la vallée du Rift (RVF) est une zoonose virale affectant principalement les animaux domestiques mais pouvant se transmettre aux humains. Elle est transmise par la piqûre d'un moustique infecté. Plusieurs syndromes ont été décrits. Habituellement les personnes atteintes ont des symptômes sans grave conséquence comme de la fièvre, des maux de tête, des myalgies et des anomalies hépatiques voire aucun symptôme. Dans un petit nombre de cas (<2%) la maladie peut évoluer vers un syndrome de fièvre hémorragique, de méningo-encéphalite (inflammation du cerveau), en encore affecter les yeux (Bouloy & Flick, 2009).

La maladie de Chagas, causée par un parasite *Trypanosoma cruzi*, se développe en deux phases : la phase aiguë peu de temps après l'infection, et la phase chronique qui peut s'étendre sur une durée de 10 ans. La phase aiguë est généralement asymptomatique mais peut s'accompagner de manifestations de type fièvre, anorexie, lymphadénopathie,

hépatosplénomégalie et myocardite. Certains cas aigus (10 à 20 % s'atténuent en 2 à 3 mois pour faire place à une phase asymptomatique, et réapparaître après plusieurs années. La phase chronique symptomatique suit une période d'incubation longue. La maladie affecte le système nerveux, le système digestif et le cœur. L'infection chronique entraîne divers troubles neurologiques, une atteinte du muscle cardiaque (cardiomyopathie qui est la complication la plus sérieuse), et parfois une dilatation du tube digestif qui entraîne une perte de poids importante. En l'absence de traitement, la maladie de Chagas s'avère mortelle dans la plupart des cas en raison d'une cardiomyopathie associée.

Comme nous pouvons l'apprécier à l'aide de ces trois exemples, chaque pathogène induit des mécanismes physiopathologiques très différents. Les étapes de colonisation par le micro-organisme, les organes atteints, la défaillance de l'organisme induisant ou non la mort du patient sont très différents en fonction des cas. C'est pour cela qu'il est très important de bien connaître le déroulement de la maladie propre à chaque agent infectieux. Ainsi, les phénotypes étudiés pour l'identification de gènes de vulnérabilité, seront plus précis et pourront refléter les étapes clés de l'évolution de la maladie.

Dans le cas où ces différentes étapes sont mal connues, le phénotype le plus simple à utiliser est la mort ou la survie de l'individu mais il manque alors de nuance dans l'appréciation de la gravité de l'infection.

### 1.2.3. Phénotypes utilisés pour caractériser un processus infectieux

#### 1.2.3.1. *Nature des caractères*

Les caractères phénotypiques sont schématiquement divisés en fonction de leur mode de variation. Un caractère qualitatif présente une variation discontinue comme par exemple la couleur du pelage des animaux ou bien la mort ou la survie des animaux (caractère binaire).

Un caractère quantitatif présente une variation continue comme le poids, un taux circulant ou la durée de survie. Il permet de classer les individus de façon plus fine que les caractères qualitatifs. Son déterminisme génétique est généralement sous le contrôle de plusieurs gènes qui interagissent et dont les effets, d'intensité inégale, dépendent de facteurs d'environnement.

Ces deux catégories reflètent la réalité de façon assez schématique et les situations rencontrées sont parfois plus complexes. Ainsi un caractère apparemment binaire (sain ou malade) peut être contrôlé par des gènes multiples qui constituent des facteurs de risque dont aucun n'est suffisant ou nécessaire.

Dans le cadre de l'étude des maladies infectieuses, différents phénotypes peuvent être étudiés à différentes étapes du processus infectieux (cf. tableau 1). En fonction des connaissances de la physiopathologie de l'infection, des phénotypes plus ou moins globaux peuvent être mesurés. Le plus global correspondant à la mort ou à la survie des individus. Après inoculation du pathogène, les organes cibles sont colonisés et une réponse immunitaire se met en place pour lutter contre ce dernier. Ces différentes étapes du processus infectieux peuvent fournir des variables pertinentes.

#### 1.2.3.2. Mort ou survie

Le phénotype le plus global est celui de la mortalité des individus suite à l'inoculation d'un pathogène. Les animaux sont inoculés avec l'agent pathogène étudié et le jour de mort des animaux est relevé quotidiennement pendant une période définie. Ce phénotype reflète l'issue globale de la maladie puisqu'elle inclut l'évolution de l'infection *in vivo* dans l'organisme entier et la mise en place d'une réponse immunitaire complexe jusqu'à la défaillance des organes vitaux qui aboutit à la mort.

Ce caractère permet de mettre en évidence deux informations différentes : une différence du taux de survie des animaux selon leur génotype, c'est-à-dire le pourcentage d'animaux résistants à la fin de la période d'observation, et une mortalité soit précoce, soit tardive au cours de l'infection (appelée par la suite phénotype de « latence »)

Ce phénotype de mort ou survie a été utilisé par exemple dans divers travaux sur la sensibilité *M. tuberculosis* réalisés à partir de différentes lignées parentales mettant en évidence plusieurs locus de résistance : *Trl1*, *Trl2* et *Trl3* (Mitsos *et al.*, 2000), *Tbs1* et *Tbs2* (Sanchez *et al.*, 2003) et *Sst1* (Kramnik *et al.*, 2000). Ce dernier s'est avéré contrôler également la survie après inoculation par *L. monocytogenes* (Pan *et al.*, 2005). Le locus *Sst1* contient un gène candidats, *Ipr1* (*Intracellular pathogen resistance*), surexprimé dans les macrophages résistants à *M. tuberculosis* et *L. monocytogenes* (Pan *et al.*, 2005)

Sebastiani G et coll., après avoir analysé le jour de mort des individus post-inoculation de  $10^3$  ufc de *Salmonella typhimurium* par voie intraveineuse, a identifié deux locus contrôlant ce phénotype : *Ity2* et *Ity3* (Sebastiani *et al.*, 1998).

Ce phénotype, de mort ou de survie, malgré sa globalité, a donc déjà permis d'identifier de nombreux locus (mais rarement les mutations causales) dans le cadre de la recherche de gènes de vulnérabilité aux maladies infectieuses.

#### 1.2.3.3. Courbe de poids

L'évolution du poids au cours de l'infection peut aussi être mesurée. Les animaux les plus sensibles sont généralement ceux qui perdent le plus de poids. Ce phénotype a été utilisé dans les travaux de Lavebratt et coll. et Sanchez et coll. qui ont mis en évidence une différence de mortalité et une perte de poids, 20 jours post-inoculation de *Mycobacterium tuberculosis*, significativement différentes entre les lignées parentales I/St et A/Sn (Lavebratt *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2003). L'étude de ces deux paramètres sur deux populations issues de deux croisements en deux générations a permis d'identifier deux régions chromosomiques sur les chromosomes 3 (*Tbs1*) et 9 (*Tbs2*) contrôlant ce caractère.

#### 1.2.3.4. Evaluation de la prolifération/dissémination de l'agent infectieux

Si des organes cibles de l'agent infectieux sont connus, la charge bactérienne, virale ou parasitaire de ces derniers peut être utilisée comme caractère quantitatif. Ce caractère permet d'évaluer la multiplication ainsi que la dissémination du pathogène dans l'organisme au cours de l'infection.

Si l'étude de la charge bactérienne oblige à euthanasier l'animal pour prélever le ou les organes d'intérêt, il est important de choisir une fenêtre temporelle permettant de discriminer au mieux les différences de vulnérabilité entre les lignées étudiées.

Mitsos et coll. ont caractérisé une différence de charge bactérienne dans les poumons 90 jours après inoculation de *M. tuberculosis* par aérosol entre les lignées C57BL/6J et DBA/2 (Mitsos *et al.*, 2003). Grâce à ces observations, ils ont pu identifier un locus appelé *Tr14* impliqué dans la résistance à ce pathogène. Des travaux identiques ont été effectués en mesurant la charge bactérienne dans la rate après inoculation de BCG (Bacille Calmette Guérin) entre les lignées C57BL/6J et SPRET/Ei (Turcotte *et al.*, 2006).

Les locus *Ity4*, *Ity5*, *Ity6*, *Ity7* et *Ity8* ont été mis en évidence en comparant la charge bactérienne dans le foie et la rate 4 jours post-inoculation de *Salmonella typhimurium* entre les lignées MOLF/Ei et C57BL/6J (Roy *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2007).

En revanche, si la mesure de la charge bactérienne peut se faire dans des compartiments accessibles sur animal vivant, comme par exemple le sang, il peut être utile de faire une cinétique de prélèvements sur les mêmes animaux.

**Tableau 1** : Exemples de QTL identifiés chez la souris, modulant la vulnérabilité à des agents pathogènes bactériens ou parasitaires. La plupart des QTL ont été localisés dans des croisements en retour ou des F2 entre lignées de laboratoire. SPRET/Ei et MOLF/Ei sont des lignées établies à partir d'individus *M. spretus* et *M. molossinus*. Les lignées AcB et Ccs sont des lignées recombinantes congéniques entre lignées de laboratoire.

Locus	Gène	Fonction	Pathogène (dose, voie injection)	Croisements	Phénotype (s) analysé(s)	Sexe	Position du QTL	Références
<i>Ity1</i>	<i>Nramp1 / Slc11a1</i>	Transporteur de fer / régulation du fer dans les phagosomes	BCG <i>S. typhimurium</i> <i>L. donovani</i>	(C57L × C57BL/6J) x C57BL/6J	mortalité	M, F	Chr 1 proximal	Malo D et al., 1993
<i>Modificateurs de Nramp1</i>	-	-	BCG (2.10 <sup>4</sup> cfu, iv)	(SPRET/Ei x C57BL/6J)x C57BL/6J	Charge bactérienne rate + splénomégalie	M ----- M ----- F ----- F	Chr 4 proximal ----- Chr X central ----- Chr 9 central ----- Chr 17 proximal	Turcotte A et al., 2006
<i>Ity2</i>	-	-	<i>S. typhimurium</i>	(MOLF/Ei x C57BL/6J)F2	mortalité	M, F	Chr 11 central	Sebastiani G et al., 1998
<i>Ity3</i>	-	-	(10 <sup>3</sup> cfu iv)			M, F	Chr 1 central	
<i>Ity4</i>	<i>Pklr</i>	Fixation des ions magnésium				M, F	Chr 3 central	Roy MF et al., 2006
<i>Ity5</i>	-	-	<i>S. typhimurium</i>	(AcB61 x 129S6) F2	Charge bactérienne rate + foie (J4 p.i.)	M, F	Chr 2 distal	
<i>Ity6</i>	-	-	(10 <sup>3</sup> cfu iv)			M, F	Chr 14	Roy MF et al., 2007
<i>Ity7</i>	-	-				M, F	Chr7	
<i>Ity8</i>	-	-				M, F	Chr 15	
<i>Myls</i>	<i>Icsbp / Irf8</i>	Régulateur de la transcription / régulation de la voie de signalisation de l'IL12 et de l'IFN $\gamma$	BCG, <i>S. typhimurium</i> , <i>P. chabaudi</i>	(BALB/c x BXH-2)F2 (A/J x BXH- 2)F2	splénomégalie	M, F	Chr 8 distal	Turcotte A et al., 2004 Turcotte A et al., 2005
<i>Tbs1</i>	-	-		(I/St x A/Sn) x I/St		M, F	Chr 3 distal	Lavebratt C et al., 1999
<i>Tbs2</i>	-	-	<i>M. tuberculosis</i> (5.10 <sup>5</sup> cfu, iv)	(I/St x A/Sn) F2	Mortalité, poids	M, F	Chr 9 proximal	Sanchez F et al., 2003

Locus	Gène	Fonction	Pathogène (dose, voie injection)	Croisements	Phénotype (s) analysé(s)	Sexe	Position du QTL	Références
<i>Trl1</i>	-	-				M, F	Chr 1 distal	
<i>Trl2</i>	-	-	<i>M. tuberculosis</i> (10 <sup>5</sup> cfu, iv)	(C57BL/6J x DBA/2J) F2	mortalité	M, F	Chr 3 central	Mitsos LM et al., 2000
<i>Trl3</i>	-	-				M, F	Chr 7 proximal	
<i>Trl4</i>	-	-	<i>M. tuberculosis</i> (2.10 <sup>2</sup> cfu, aérosol)	(C57BL/6J x DBA/2J) F2	Charge bactérienne poumons (J90 p.i.)	M, F	Chr 19 distal	Mitsos et al., 2003
<i>Sst1</i>	<i>Ipr1 / sp110</i>	Régulateur de la transcription / activateur de la transcription en réponse à un pathogène intracellulaire	<i>M. tuberculosis</i> (10 <sup>6</sup> cfu, iv) <i>L. monocytogenes</i> (10 <sup>4</sup> cfu, iv)	(C3HeB/FeJ x C57BL/6J) F2	mortalité	M, F	Chr 1	Kramnik I et al., 2000 Pan H et al., 2005
<i>Lmr1</i>							Chr 17 (H2 region)	
<i>Lmr2</i>	-	-	<i>L.major</i> V121 (105, id à la base de la queue)	(BALB/c x C57BL/6)F2	taille des lésions	M, F	Chr 9 central / proximal	Roberts LJ et al., 1997
<i>Lmr30</i>							Chr X	
<i>Lmr3</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS5 x BALB/c)F2	Splenomegalie, hepatomegalie, IgE sérum, IFNg sérum	M, F	Chr 5 central	Lipoldova L et al., 2000 Badalova H et al., 2002 Havelkova H et al., 2006
<i>Lmr4</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS5 x BALB/c)F2	taille des lésions, IFNg sérum	M, F	Chr 6 central	Lipoldova L et al., 2000
<i>Lmr5</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS5 x BALB/c)F2 (CcS20 x BALB/c)F2	Splenomegalie, taille des lésions, IgE sérum, IL12 sérum, IFNg sérum	M, F	Chr 10 distal / central	Lipoldova L et al., 2000 Badalova H et al., 2002 Havelkova H et al., 2006

Locus	Gène	Fonction	Pathogène (dose, voie injection)	Croisements	Phénotype (s) analysé(s)	Sexe	Position du QTL	Références
<i>Lmr6</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS5 x BALB/c)F2	IL4 sérum Prolifération spontanée	M, F	Chr11 proximal	Lipoldova L et al., 2000
<i>Lmr7</i>							Chr 17 proximal	
<i>Lmr8</i>					IgE sérum, Prolifération spontanée		Chr 1 distal	
<i>Lmr9</i>					IgE sérum, IL6 sérum		Chr 4 proximal	
<i>Lmr10</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS20 x BALB/c)F2	IgE sérum, taille des lésions, splénomégalie	M, F	Chr 8 proximal	Badalova H et al., 2002 Havelkova H et al., 2006
<i>Lmr11</i>							IgE sérum, IL6 sérum	
<i>Lmr12</i>					IgE sérum, TNFa sérum, IFNg sérum, Prolifération spontanée		Chr 16 central	
<i>Lmr13</i>					IgE sérum, Lesion de la peau, TNFa sérum		Chr 18 central / distal	Badalova H et al., 2002
<i>Lmr14</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS16 x BALB/c)F2	IgE sérum, Splénomégalie, hépatomégalie, IFNg sérum, IL12 sérum, TNFa sérum	M, F		Vladimirov V et al., 2003
				(CcS20 x BALB/c)F2			Chr 2 central, distal	Havelkova H et al., 2006
<i>Lmr15</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS16 x BALB/c)F2	hépatomégalie	M, F	Chr 11 central	Vladimirov V et al., 2003

Locus	Gène	Fonction	Pathogène (dose, voie injection)	Croisements	Phénotype (s) analysé(s)	Sexe	Position du QTL	Références
<i>Lmr16</i>					Prolifération spontanée		Chr 2 distal	
<i>Lmr17</i>	-	-	<i>L.major</i> LV561 (107, sc bas du dos)	(CcS20 x BALB/c)F2	TNFα sérum,	M, F	Chr 9	Havelkova H et al., 2006
<i>Lmr18</i>		IFN γ sérum			proximal			
<i>Lmr19</i>		Prolifération spontanée			Chr 16 central / distal			
<i>Lmr19</i>					Prolifération spontanée		Chr 10 central	
<i>Lmrq1</i>							Chr 6 distal	
<i>Lmrq2</i>							Chr 7 distal	
<i>Lmrq3</i>	-	-	<i>L.major</i> WHOM173 (107, sc patte gauche)	((B10.D2 x BALB/c)F1 x BALB/c)	Taille des lésions	M, F	Chr 10 distal	Beebe AM et al., 1997
<i>Lmrq4</i>		Chr 11						
<i>Lmrq5</i>		proximal						
<i>Lmrq6</i>		Chr 15 central						
		Chr 16 distal						
<i>Char1</i>	-	-	<i>P. chabaudi</i> adami DS (10 <sup>4</sup> parasites, ip)	(C3H x B6)F2 (SJF x B6)F2	Parasitémie sang 4 j.p.i.	M, F	Chr 9 proximal	Foote S et al., 1997
<i>Char2</i>					Parasitémie sang 10 j.p.i.		Chr8 central	Burt RA et al., 1999
<i>Char3</i>	-	-	<i>P. chabaudi</i> adami DS (10 <sup>4</sup> parasites, ip) <i>P. chabaudi</i> 54X (3.10 <sup>6</sup> parasites, ip)	(C3H x B6)F2 (A x B6)F11 AIL	Parasitémie sang 10 j.p.i. Parasitémie sang (PR1)	M, F	Chr 17 (H2)	Burt RA et al., 1999 Hernandez-Valladares M et al., 2004
<i>Char4</i>	<i>pklr</i>	Pyruvate kinase activity	<i>P. chabaudi</i> AS (10 <sup>6</sup> parasites, ip)	(AcB55 x A/J)F2	Parasitémie sang 11 j.p.i.	M, F	Chr 3 distal	Fortin Aet al., 2001

Locus	Gène	Fonction	Pathogène (dose, voie injection)	Croisements	Phénotype (s) analysé(s)	Sexe	Position du QTL	Références
<i>Char5</i>					Parasitémie sang (PR1)		Chr 5 central / distal	
<i>Char6</i>	-	-	<i>P. chabaudi</i> 54X (3.10 <sup>6</sup> parasites, ip)	(A/J x B6)F11 AIL	Parasitémie sang (PR2)	M, F	Chr 5 distal	Hernandez-Valladares M et al., 2004
<i>Char7</i>					Parasitémie sang (PR1)		Chr 17 central	
<i>Char8</i>					Parasitémie sang (PR1)		Chr11 proximal	
<i>Char9</i>	<i>Vnn1 / Vnn3</i>	Pantetheinase / production de cystéamine	<i>P. chabaudi</i> AS (10 <sup>6</sup> parasites, ip)	(AcB55 x A/J)F2	Parasitémie sang	M, F	Chr 10 proximal	Min-Oo G et al., 2001

Dans le cas du paludisme, Burt RA et coll. ont prélevé du sang sur les mêmes animaux pour suivre l'évolution de la parasitémie le 10<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour après inoculation de *Plasmodium chabaudi* (Burt *et al.*, 1999). Ainsi, ils ont pu identifier des locus différents contrôlant la parasitémie aux différents stades de l'infection.

La charge bactérienne, virale ou parasitaire dans un organe cible est dans la majorité des cas corrélée avec la mortalité. Les animaux succombant à l'infection ont généralement une charge très élevée alors que les animaux résistants ont une charge plus faible. Dans le cas où cette corrélation est caractérisée, le choix se porte sur la mesure de la charge comme phénotype. C'est l'un des phénotypes les plus mesurés dans le cadre de l'étude des maladies infectieuses.

#### 1.2.3.5. *Suivi des réponses inflammatoires et immunes*

L'étude des réponses inflammatoires et immunitaires mises en œuvre lors du processus infectieux permet de quantifier les réactions actives de l'hôte. Des études faites sur *Leishmania major*, dont le processus immunitaire est déjà bien décrit, ont été faites en mesurant différents paramètres comme certaines cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6 et IL-12) ou l'immunoglobuline de type E (IgE). L'analyse de ces différents éléments a permis de mettre en évidence 12 locus contrôlant la production de ces molécules au cours de l'infection. La diversité des phénotypes permet de caractériser différentes étapes du processus inflammatoire et immunitaire et de mettre en évidence à la fois des locus communs qui contrôlent plusieurs paramètres à une période donnée mais aussi des locus spécifiques.

#### 1.2.3.6. *Lésions histologiques*

Au cours de l'infection, des lésions histologiques peuvent apparaître au niveau d'organes cibles comme par exemple les poumons pour la tuberculose ou la peste pulmonaire.

Les lésions observées après inoculation de *Leishmania major* ont été utilisées comme phénotypes pour identifier des locus contrôlant ce caractère (cf. tableau 1) (Lipoldova *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1997). Quatre régions chromosomiques ont ainsi pu être liées à ce caractère. Le foie et la rate étant également touchés en cas de leishmaniose, la splénomégalie et l'hépatomégalie ont aussi été mesurées.

Le virus de Theiler induit, lors d'infection chronique, des lésions de démyélinisation dont la sévérité est plus ou moins corrélées au titre viral dans le système nerveux central et à la gravité des paralysies (Brahic & Bureau, 1998).

L'étude de ces lésions histologiques a permis de mettre en évidence différents facteurs génétiques contrôlant ces lésions notamment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ).

#### 1.2.4. Identification de gènes responsables des phénotypes analysés

##### 1.2.4.1. *Variabilité des caractères*

Un phénotype quantitatif mesuré dans un groupe d'individus s'exprime par une moyenne et un écart type. Le phénotype varie en fonction de la composition génétique de l'individu, de l'environnement au sens large ou de l'observateur. Le même phénotype mesuré de façon répétée (lorsque cela est possible) chez un même individu dans des conditions expérimentales strictement identiques conduit à une série de valeur dont les variations correspondent à la variabilité intra-individuelle. Les fluctuations entre les mesures effectuées sur des individus identiques quant à leur composition génétique, sexe, âge, et facteurs d'environnement correspondent à la variabilité inter-individuelle. Les fluctuations qui ne sont pas réductibles expérimentalement sont qualifiées de variabilité résiduelle.

La variable phénotypique P correspond au résultat de la mesure effectuée sur un individu. Elle résulte de la composition génétique G de l'individu (c'est-à-dire la combinaison des allèles qu'il porte, les interactions entre ces allèles ainsi que leur degré d'expression) et de l'influence que peuvent exercer plusieurs variables de milieu qui constituent l'environnement E de l'individu. On exprime ainsi la valeur phénotypique par une relation additive (Lynch & Walsh, 1998) :

$$P = \mu + G + E + G \times E$$

où  $\mu$  représente la moyenne phénotypique de la population, G la valeur génotypique de l'individu, E l'effet du facteur d'environnement s'exerçant sur l'individu et G X E les interactions entre composition génétique et environnement. L'effet de ce dernier pouvant varier selon le phénotype de l'individu. Pour l'analyse statistique des résultats, il est nécessaire de décomposer les origines de la variance des données. On peut écrire de manière analogue :

$$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E + \sigma^2_{G \times E} + \sigma^2_R$$

où  $\sigma^2_R$  représente la variance résiduelle.

#### 1.2.4.2. *Notion de QTL*

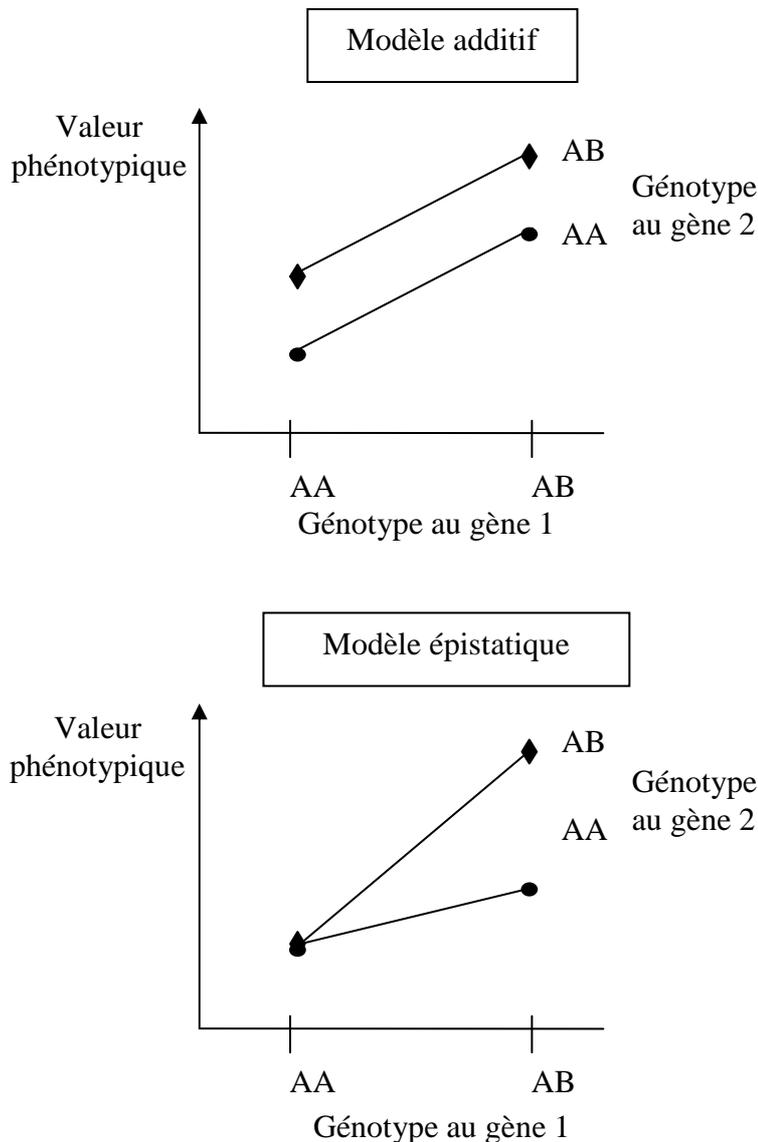
Lorsque l'on compare le phénotype des individus d'une population issue d'un croisement avec leur composition génétique, on constate souvent qu'il existe une ou plusieurs associations entre une différence de valeur phénotypique pour le caractère quantitatif étudié et une différence de génotype à certaines régions du génome. Lorsque cette association est statistiquement significative on conclut à la présence d'un ou plusieurs QTL ou Quantitative Trait Locus. Un QTL se définit donc comme un locus dont au moins deux formes alléliques sont associées à des valeurs phénotypiques moyennes différentes pour le caractère étudié. Un caractère quantitatif peut être sous le contrôle d'un ou plusieurs QTL. Un QTL est donc un locus dont l'unité de fonction contribue, pour une part plus ou moins importante, à l'élaboration d'un caractère quantitatif.

Un caractère quantitatif est généralement sous le contrôle de plusieurs QTL. Le modèle le plus simple en génétique quantitative est le modèle additif dans lequel plusieurs gènes agissant de façon indépendante additionnent les effets des allèles que chacun d'entre eux portent, déterminant ainsi la valeur phénotypique pour le caractère quantitatif. Dans ce modèle, les valeurs phénotypiques moyennes, qui sont les plus représentées dans une population génétiquement hétérogène, peuvent résulter de différentes combinaisons d'allèles.

Cependant le modèle additif ne permet pas toujours d'expliquer les données expérimentales. On doit alors faire l'hypothèse d'une interaction épistatique entre les différents gènes. L'effet des allèles portés à un locus dépend alors du génotype à un ou plusieurs autres locus (cf. figure 2).

La valeur phénotypique d'un groupe génétiquement homogène élevé dans les mêmes conditions s'exprime par une valeur moyenne et un écart type. Il n'existe pas de corrélation stricte entre le génotype et le phénotype. Il n'est pas possible sur la base d'une valeur phénotypique de connaître le génotype de l'individu à un locus précis car plusieurs combinaisons génotypiques peuvent aboutir à une même valeur phénotypique moyenne.

Chaque QTL participe pour une part plus ou moins importante à l'élaboration du phénotype. On dit que chaque QTL a une force qui lui est propre. De plus, le nombre de QTL gouvernant un caractère est fonction du paramètre étudié mais aussi du protocole mis en œuvre pour détecter ces QTL. En effet, la taille du croisement et le type de croisement influencent la détection de QTL. Un croisement de petite taille (petit nombre d'animaux analysés) sera moins



**Figure 2 : Valeurs phénotypiques en fonction du génotype aux deux gènes gouvernant le caractère quantitatif étudié, selon leur mode d'interaction.**

Dans le modèle additif, le gène 1 augmente la valeur phénotypique des hétérozygotes AB par rapport aux homozygotes AA avec la même amplitude quelque soit le génotype au gène 2, et réciproquement. La valeur phénotypique la plus haute est obtenue lorsque l'individu est hétérozygote pour les deux gènes. Les deux gènes additionnent donc leurs effets. Dans le modèle épistatique, l'augmentation de la valeur phénotypique entre les homozygotes AA et les hétérozygote AB pour le gène 1 est plus importante chez les hétérozygotes AB au gène 2 que chez les homozygotes AA. Il y a une interaction épistatique entre les deux gènes.

puissant pour détecter des QTL qu'un croisement de grande taille : il y aura donc une plus grande probabilité de ne pas détecter des QTL de force moyenne ou faible. De plus, le choix des lignées parentales d'un croisement revêt une importance majeure car ne sont détectables que les QTL qui sont polymorphes entre ces lignées. Enfin, certains types de croisements permettent mieux que d'autres de mettre en évidence des interactions entre QTL ou des QTL de faible force. Ainsi, le choix du protocole est-il essentiel lors de la mise en œuvre d'une recherche de QTL.

#### 1.2.4.3. Localisation génétique des QTL : principes généraux

##### 1.2.4.3.1. Marqueurs moléculaires

La recherche de QTL nécessite une connaissance précise de la carte génétique de l'espèce étudiée. La construction de la carte génétique s'effectue à partir du positionnement des marqueurs génétiques les uns par rapport aux autres. Il ne s'agit pas tant de mesurer la distance qui sépare deux marqueurs, que d'établir de façon certaine l'ordre des marqueurs le long d'un chromosome.

On appelle marqueur génétique toute variation stable du génome dont il est possible de suivre la transmission au cours des générations. Pour qu'un marqueur puisse être utilisable, il est indispensable qu'il soit polymorphe, c'est-à-dire qu'il existe au moins sous deux formes alléliques. Il existe une grande variété de marqueurs. Les deux types utilisés pour la recherche de liaison génétique et de QTL sont actuellement les microsatellites et les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Les microsatellites sont des séquences d'ADN qui contiennent une répétition en tandem d'un motif très court, d'une longueur comprise entre 2 et 6 nucléotides. Leur intérêt est que la longueur d'une répétition particulière qui correspond à un locus précis dans le génome est susceptible de varier entre individus. En utilisant des amorces spécifiques des séquences uniques de part et d'autre d'une séquence microsatellite, il est facile d'amplifier un fragment d'ADN dont la longueur dépend uniquement du nombre de répétition du motif. Plus de 10 000 microsatellites ont été identifiés chez la souris. Leur principal avantage réside dans la grande facilité de génotypage (une simple PCR suivie d'une électrophorèse) et leur répartition homogène dans le génome de la souris.

Le développement des techniques de séquençage a mis en évidence l'existence de variations d'une seule paire de base du génome entre individus d'une même espèce appelées SNP. Ces variations sont très fréquentes. Plus de 8 millions de SNP ont été caractérisés chez la

souris. Les SNP peuvent se retrouver au sein de régions codantes ou non codantes de gènes, ou des régions intergéniques. Les SNP se situent au sein des régions codantes ne modifient pas nécessairement la séquence d'acide aminé de la protéine produite, du fait de la redondance du code génétique. On parle de formes alléliques *synonymes* dans le cas où plusieurs formes d'un SNP mènent à la même séquence polypeptidique, et de formes *non synonymes* dans le cas où les séquences produites diffèrent. Le génotypage des SNP peut être effectué à très grande échelle (plusieurs centaines de milliers ou millions de marqueurs) mais demande des équipements sophistiqués (séquençage à grande échelle, hybridations sur lame à très haute densité).

#### 1.2.4.3.2. Localisation des QTL

La localisation génétique de QTL contrôlant un caractère quantitatif passe par l'analyse d'une population présentant une dispersion des valeurs phénotypiques et en ségrégation pour un nombre important de marqueurs génétiques polymorphes. Nous étudierons plus loin les différents types de populations disponibles chez la souris et discuterons de leurs avantages et inconvénients respectifs. Dans tous les cas, il est indispensable pour maximiser l'expérience d'établir, avec les plus grandes précision et reproductibilité possibles, le phénotype de chaque individu. Tout manque de rigueur se traduit par une augmentation de la variance résiduelle des données et affaiblit donc la signification statistique des résultats. Il faut également disposer du génotype des animaux pour un nombre suffisant de marqueurs génétiques (environ tous les 15 cM pour un croisement F2 ou un croisement en retour, 5 cM pour des lignées recombinantes consanguines).

La recherche de QTL consiste à calculer, pour chaque marqueur la moyenne et l'écart type du caractère quantitatif considéré pour chaque groupe d'individus de même génotype (*a/a* ou *a/b* pour un croisement en retour, *a/a*, *a/b* ou *b/b* pour une F2, *a/a* et *b/b* pour les lignées recombinantes consanguines, etc.). On compare ensuite les moyennes de chaque groupe génotypique à l'aide d'un test statistique approprié, en général une analyse de la variance (ANOVA) (Lander & Botstein, 1989). Si la comparaison révèle une différence statistiquement significative entre les génotypes, on en déduit que les différents génotypes au marqueur considéré sont associés à des valeurs phénotypiques moyennes différentes, ce qui par définition indique la présence d'un QTL au voisinage de ce marqueur.

En réalisant la même analyse dite « point par point » pour des marqueurs génétiques situés au voisinage du premier, il est possible de déterminer la position le long du chromosome qui est associée à la plus forte différence de valeur moyenne et qui correspond à la position la plus vraisemblable pour le QTL. Le test statistique couramment utilisé est le LOD score qui

mesure le rapport de deux vraisemblances : celle d'observer les valeurs phénotypiques moyennes aux génotypes sous l'hypothèse de l'existence d'un QTL à la position testée, et celle de les observer sous l'hypothèse de l'absence de QTL. Le LOD score est le logarithme à base 10 de ce rapport. On conclut à la présence d'un QTL lorsqu'il dépasse un seuil fixé soit en fonction des types de croisement, soit calculé empiriquement par permutation des données.

#### 1.2.4.3.3. Cartographie par intervalle

L'analyse point par point permet de calculer un LOD score pour tous les marqueurs qui ont été génotypés le long d'un chromosome. Ces marqueurs peuvent toutefois être espacés de 20 ou 30 cM et il est intéressant de connaître la valeur que prendrait le LOD score pour des positions intermédiaires. Ceci est particulièrement utile lorsque la valeur du LOD score pour un marqueur donné ou plusieurs marqueurs liés est suffisamment élevée pour suggérer la présence d'un QTL dans la région. En calculant le LOD score tout au long des intervalles, on peut préciser la position du QTL par rapport aux marqueurs étudiés.

La méthode utilisée repose sur un algorithme de recherche du maximum de vraisemblance. Puisque l'on ne connaît pas le génotype des animaux entre deux marqueurs, un programme informatique génère pour une position intermédiaire donnée, les génotypes possibles pour chaque animal, en fonction du génotype aux deux marqueurs situés de part et d'autre, en fonction des fréquences de recombinaison qui maximise le LOD score maximal (algorithme E.M.). Ainsi, pour chaque position le long de l'intervalle, le programme calcule le LOD score maximal qui pourrait être observé si tous les animaux avaient des génotypes favorables à ces positions intermédiaires. Ces résultats doivent toujours être contrôlés en génotypant les animaux pour des positions intermédiaires, dans toutes les régions où un QTL est détecté.

Mapmaker/QTL (Lander & Botstein, 1989) et Mapmanager/QTXT (Manly *et al.*, 2001) ont été longtemps les deux programmes de référence pour la cartographie des QTL dans les croisements entre lignées de souris. Plus récemment, le programme R/QTL a été développé par Karl Broman en utilisant la suite statistique R. R/QTL (Broman, 2003) intègre non seulement les tests paramétriques, mais aussi non paramétriques et l'analyse des données binaires. R/QTL possède également des fonctions pour optimiser l'analyse des courbes de survie obtenues lors de l'analyse d'un phénotype de mortalité. Une courbe de survie montre le taux de survie d'une population d'animaux chaque jour post-injection. Cette courbe regroupe deux données: 1) le taux de survie final obtenu à la fin de la période d'observation (en pourcentage, donnée individuelle binaire) et 2) le jour de mort de chacun des individus qui ont succombé à l'infection (en jours,

donnée quantitative). Le « modèle two-part » combine la recherche de QTL pour ces deux types de données. Un premier LOD score, noté  $LOD_p$ , correspond à l'analyse du taux de survie final. Le second, noté  $LOD_\mu$ , est calculé à partir du jour moyen de mort des individus qui ont succombé à l'infection. Ces deux LOD score sont additionnés pour obtenir un  $LOD_{p,\mu}$  correspondant au modèle « two-part » proprement dit.

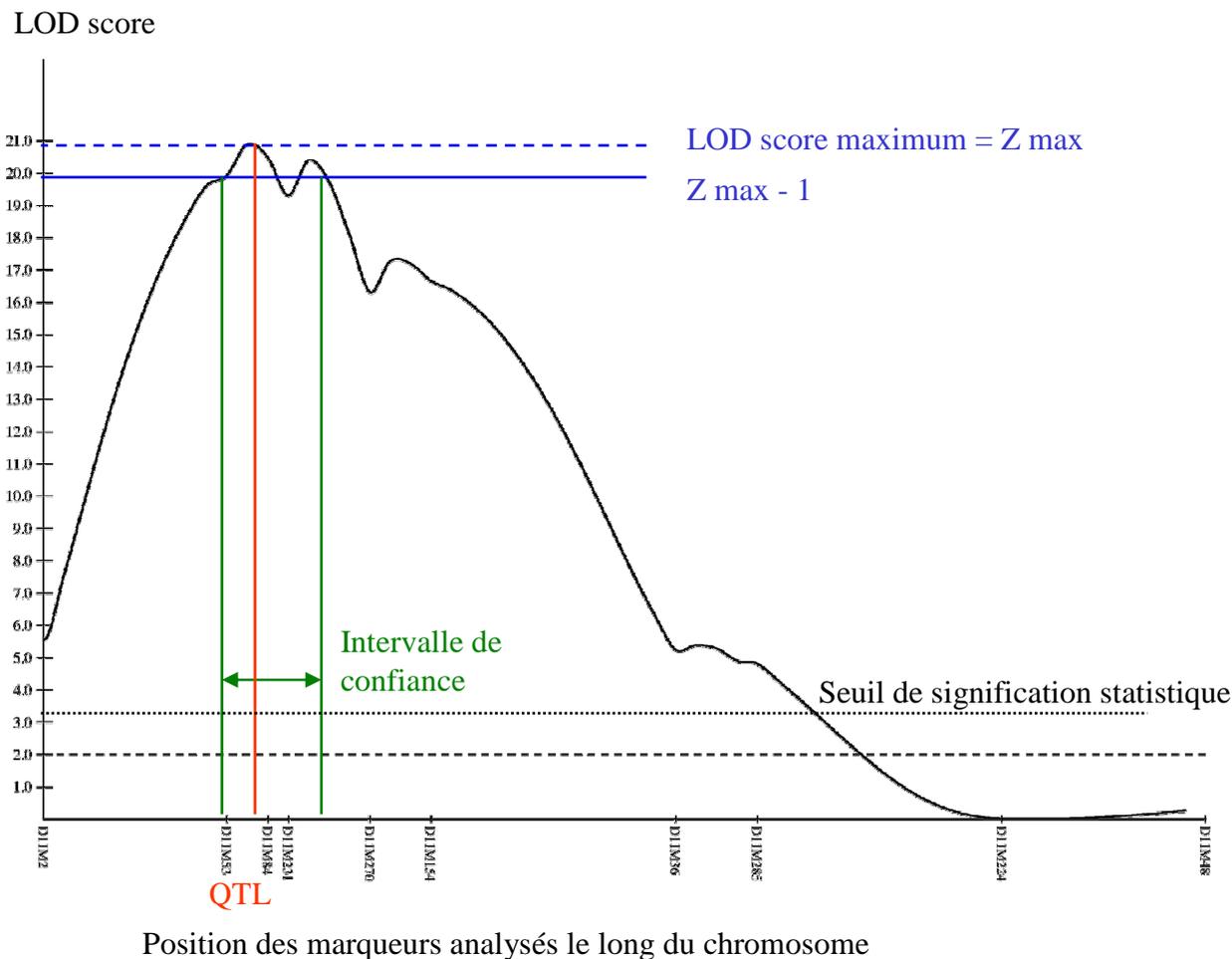
Cette analyse permet d'identifier des QTL de vulnérabilité/résistance à l'infection mais aussi de distinguer ceux qui agissent sur le taux de survie et/ou sur le jour moyen de mort des animaux sensibles en comparant pour le  $LOD_{p,\mu}$ , la valeur prise par le  $LOD_p$  et celle du  $LOD_\mu$ .

Grâce à ces méthodes, la présence d'un QTL à une position donnée du génome est définie en termes de probabilité avec un certain risque de faux positifs. Plus le LOD score est élevé, plus la probabilité de présence du QTL à cette position est grande. De la même manière, la localisation du QTL ne peut être déterminée avec certitude : la position la plus probable du QTL se trouve au point culminant de la courbe de LOD score (cf. figure 3). Ce n'est cependant que la position la plus probable et on calcule un intervalle de confiance dont les bornes sont définies en fonction d'un compromis entre une taille raisonnable et un risque d'erreur consenti. En pratique, les bornes de l'intervalle de confiance correspondent aux positions pour lesquelles le LOD score prend une valeur inférieure d'une unité à celle du pic (cf. figure 3).

#### 1.2.4.3.4. Traitement statistique des résultats

Le type de test statistique utilisé pour comparer les moyennes des différents génotypes à un marqueur dépend de la distribution des valeurs du paramètre étudié dans la population croisement en retour ou F2 analysée. Si cette distribution suit une loi normale, naturellement ou après un changement de variable, il est possible d'utiliser des tests paramétriques tels que le test de Student t pour deux moyennes ou une analyse de variance (ANOVA) pour plusieurs moyennes. Si la distribution ne suit pas la loi normale, même après une transformation des variables, il est nécessaire d'utiliser des tests non paramétriques qui n'utilisent pas les valeurs absolues des données mais leurs valeurs relatives, que l'on appelle leur rang. Le test U de Mann-Whitney représente l'équivalent non paramétrique du test t. Il est utilisable dans le cas d'un croisement en retour (2 classes) alors que pour une F2 on choisira le test de Kruskal-Wallis (3 classes).

Dans le cas d'une comparaison de pourcentages (par exemple des taux de survie), un test de Khi-deux sera utilisé.



**Figure 3 : Courbe de LOD score obtenue par cartographie d'intervalle.**

L'axe des abscisses représente le chromosome avec la position des marqueurs analysés. L'axe des ordonnées représente les valeurs du LOD score noté Z. La courbe indique le LOD score associé à la présence d'un QTL à chaque position le long du chromosome. Si la courbe dépasse le seuil de signification, on en déduit l'existence d'un QTL sur le chromosome. Le pic de LOD score indique la position la plus probable du QTL. L'intervalle de confiance de cette position est habituellement calculé en prenant les positions associées à un LOD score inférieur d'une unité au pic de la courbe.

#### 1.2.4.3.5. Force d'un QTL

Lorsqu'un QTL a été identifié à proximité d'un marqueur avec une certaine probabilité statistique, on peut évaluer la force de son effet sur le caractère étudié en mesurant la part de la variance génétique qu'il contrôle.

Dans la partie 1.2.4.1., nous avons défini les différentes composantes de la variance phénotypique totale du croisement. En négligeant le terme  $\sigma^2_{GXE}$ , on peut écrire :

$$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E + \sigma^2_R$$

Si on traite les données par une analyse de la variance en prenant comme facteur le génotype des animaux au marqueur étudié (à proximité duquel se trouve le QTL), on peut calculer la variance entre les groupes de génotypes notée  $\sigma^2_Q$  et la variance à l'intérieur de chacun des groupes de génotype (2 groupes de génotype *a/a* ou *a/b* dans le cas d'un *croisement en retour*), qui vaut  $\sigma^2_G - \sigma^2_Q$ .

La part de la variance génétique expliquée par le QTL est égale au rapport  $\sigma^2_Q$  sur  $\sigma^2_G$ . Plus ce rapport est élevé, plus la part de la variance phénotypique expliquée par le QTL est importante, donc son effet est fort.

#### 1.2.4.4. Les outils génétiques disponibles chez la souris pour la recherche de QTL

La souris est un modèle d'étude puissant pour la recherche de QTL chez les mammifères. En effet, cette espèce offre des avantages substantiels tels que la facilité de croisement (espèce très prolifique avec un nombre de petits par portée pouvant atteindre 12), le temps de génération (11 à 13 semaines), l'existence de lignées de laboratoire consanguines, la possibilité de transférer facilement une région génomique d'un fonds génétique consanguin à un autre, de modifier les gènes à volonté, une systématique et une évolution du genre *Mus* bien connue et la possibilité de produire des hybrides à partir de géniteurs appartenant à des espèces différentes.

L'existence de lignées consanguines permet de se placer dans des conditions génétiques simples et contrôlées. Les facteurs d'environnement peuvent être standardisés à l'extrême dans des animaleries modernes. En choisissant le type et la taille du croisement utilisé, il est possible d'ajuster la résolution finale de la localisation génétique des QTL. Chaque gène peut ensuite être testé en transgènèse ou par recombinaison homologue ou être isolé dans des lignées congéniques. Il devient alors possible d'affiner la localisation du QTL, de confirmer son existence, d'étudier ses effets biologiques propres et d'étudier ses interactions avec d'autres locus.

#### 1.2.4.4.1. Croisements en deux générations

Après avoir caractérisé une différence de sensibilité entre deux lignées consanguines, l'une des approches pour identifier les facteurs génétiques responsables de cette différence est de produire une population en ségrégation entre ces deux lignées à l'aide de croisements en deux générations.

Les croisements en deux générations (croisement en retour ou F2) entre deux lignées consanguines de souris de laboratoire ont été largement employés comme stratégie expérimentale dans la cartographie des QTL pour un grand nombre de phénotypes. Chaque individu analysé représente un réassortiment unique et non fixé des deux génomes parentaux. Tous les individus qui présentent le même génotype à un marqueur donné portent des génotypes différents aux autres marqueurs du génome. Ainsi lorsque l'on compare les valeurs phénotypiques moyennes des homozygotes et des hétérozygotes à ce marqueur, l'hétérogénéité génétique des individus à l'intérieur des deux groupes de génotypes est responsable d'une variabilité phénotypique intra groupe qui affaiblit la puissance de la comparaison.

Darvasi (1998) a réalisé des simulations afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaires à la cartographie d'un QTL (Darvasi, 1998). Pour ces deux types de croisements, l'inflation du nombre de souris nécessaire est importante pour passer d'une résolution de 5 à 25 cM (supérieure à 1 000 animaux quelle que soit la force du QTL) à une résolution de 1 à 5 cM (près de 10 000 animaux). Le choix d'un croisement en retour ou d'une F2 dépend des objectifs fixés pour la détection des QTL. Un croisement en retour peut être d'une plus grande efficacité pour la détection d'un QTL majeur tandis que l'analyse d'une population F2 semble plus adaptée pour avoir une idée générale des QTL en ségrégation sans a priori sur leur force et la dominance des allèles (Darvasi, 1998). Par exemple pour détecter des QTL additifs, le nombre de souris nécessaires pour une F2 est de 30% inférieur à un croisement en retour tandis que pour des QTLs dominants, le nombre de souris nécessaires pour une F2 est deux fois supérieur par rapport à un croisement en retour (Darvasi, 1998).

Après avoir phénotypé une population d'individus issus d'un croisement en deux générations, le génotypage de ces derniers doit être effectué. Dans le cas où le nombre d'individus est important, un génotypage avec une densité suffisante de marqueurs est longue et fastidieuse à entreprendre. Il est par conséquent possible d'analyser, dans un premier temps, uniquement les individus dits « extrêmes ». Par exemple, dans le cas d'une étude de mortalité, l'utilisation d'une partie des individus les plus sensibles (morts dès le début de la période

d'observation après inoculation) et d'une partie des individus les plus résistants (n'ayant pas succombé à l'infection) peut suffire pour identifier des QTL impliqués sur le taux de survie. Manichaikul A. et Broman KW (2009) ont montré que cette stratégie était très efficace pour cartographier des QTL en illustrant leurs propos avec un exemple sur *Listeria monocytogenes* publié par Boyartchuk et coll. (Boyartchuk *et al.*, 2001; Manichaikul & Broman, 2009). Dans cet exemple, deux QTL ont été mis en évidence sur les chromosomes 5 et 13 contrôlant la survie après inoculation de  $10^4$  ufc de *L. monocytogenes* sur une population de 116 individus (35 résistants et 81 sensibles) issus d'une F2 entre les lignées C57BL/6J (résistantes) et BALB/cByJ (sensibles). Ces individus ont été génotypés avec 131 marqueurs microsatellites répartis sur les 19 autosomes. L'analyse QTL a été faite avec R/QTL en utilisant le modèle « two-part » (Broman, 2003) et a montré que ces QTL agissaient principalement sur le taux de survie.

A partir de ces résultats, Manichaikul A et Broman KW (2009) ont testé la possibilité d'identifier des QTL en n'utilisant qu'une partie des individus (Manichaikul & Broman, 2009). Les individus les plus extrêmes ont été choisis de façon égale (35 sensibles et 35 résistants) et la survie a été analysée. Les résultats montrent que les deux QTL des chromosomes 5 et 13 sont bien identifiés aux mêmes positions qu'avec la population entière, même si les valeurs de LOD score obtenues sont un peu plus faibles. Les 70 individus extrêmes contiennent donc l'essentiel de l'information génétique du croisement.

Quel que soit le phénotype observé, plusieurs croisements en deux générations peuvent être effectués à partir de différentes lignées présentant les mêmes caractéristiques de départ dans le but d'identifier des régions chromosomiques communes et de diminuer les intervalles de confiance (et donc le nombre de gènes présents) ou identifier de nouveaux locus.

Mitsos et coll. ont mis en évidence une différence de sensibilité entre les souris C57BL/6J (dite résistante), qui meurent entre 190 et 290 jours post-inoculation et DBA/2J (dite sensible), qui meurent entre 80 et 120 jours après une inoculation de  $10^5$  ufc de *M. tuberculosis* par voie intraveineuse (Mitsos *et al.*, 2000). En analysant le jour de mort d'une population de 95 souris (C57BL/6J x DBA/2J)F2, ils ont mis en évidence 3 QTL : *Trl1* (chromosome 1) dont le gène causal est très probablement *Nramp1* déjà décrit par Vidal et coll., *Trl2* (chromosome 3) et *Trl3* (chromosome 7) (Vidal *et al.*, 1995). Ces trois locus semblent agir de façon additive.

Quelques années plus tard, Mitsos coll. ont mis en évidence une différence de charge bactérienne dans les poumons entre les mêmes lignées parentales dans la phase tardive de l'infection (90 jours post inoculation par aérosol de  $2.10^2$  ufc de *M. tuberculosis* (Mitsos *et al.*,

2000). Après avoir phénotypé et analysé 98 (C57BL/6J x DBA/2J)F2 pour ce caractère, ils ont identifié les locus *Trl3* (chromosome 3) et *Trl 4* (chromosome 19). Le locus *trl3* avait déjà été identifié lors de la première étude. Ce locus semble posséder un (ou plusieurs) gène(s) capable de contrôler la sensibilité à une infection par *M. tuberculosis* aussi bien lors d'une infection systémique (injection par voie intraveineuse) que pulmonaire (aérosol). L'utilisation de différentes voies d'inoculation et différents phénotypes permet de mettre en évidence certains locus spécifiques de chacun des modèles mais aussi des régions chromosomiques communes. Chaque locus a un effet assez important sur les phénotypes puisqu'ils expliquent entre 20 et 25% de la variance phénotypique.

De plus, l'utilisation des mêmes lignées pour différents pathogènes permet d'identifier des régions chromosomiques communes. L'exemple le plus connu est celui de *Nramp1* (aussi appelé *Slc11a1*) qui joue un rôle primordial dans la vulnérabilité au BCG, à *Salmonella typhimurium* et à *Leishmania donovanni* (Vidal *et al.*, 1995).

L'inconvénient des croisements en deux générations est la taille de l'intervalle de confiance du QTL. Il n'est pas rare que celui-ci soit très grand et contienne beaucoup de gènes. Nous verrons plus loin comment il est possible de combiner différents croisements pour diminuer la taille de ces intervalles.

Un autre inconvénient est que chaque animal est unique et donc que le phénotype associé à un génotype particulier ne peut être répliqué. Il est donc très important que tous les individus soient phénotypés avec le plus grand soin et dans les mêmes conditions expérimentales.

De plus, ces croisements imposent l'analyse d'un nombre important d'animaux. Les différentes études présentées dans le tableau 1, ont porté sur une centaine d'individus au moins (Mitsos *et al.*, 2000) et jusqu'à plus de 500 pour une étude sur *Leishmania major* (Badalova *et al.*, 2002).

#### 1.2.4.4.2. Lignées recombinantes consanguines

L'une des caractéristiques essentielles des caractères à hérédité complexe est l'absence de corrélation absolue entre le génotype et le phénotype. Cette propriété est responsable de l'efficacité relativement faible des croisements en deux générations pour la localisation précise de QTL. Cette limitation a incité de nombreux expérimentateurs à étudier des caractères complexes en faisant appel aux lignées recombinantes consanguines.

Cette stratégie expérimentale a été mise en œuvre chez la souris depuis les années 1970 par Benjamin Taylor et Donald Bailey au Jackson laboratory (Bailey *et al.*, 1971). Les lignées recombinantes consanguines (*Recombinant Inbred Strains* ou RIS) sont établies en croisant deux individus F2 issus d'un croisement entre deux lignées de souris consanguines, puis en réalisant des accouplements ininterrompus frère/sœur pendant au moins 20 générations. En moyenne, chaque lignée consanguine ainsi obtenue hérite de la moitié des allèles qu'elle porte de chacune des deux lignées consanguines parentales. Les lignées ont une composition génétique indépendante les unes des autres, unique et non répliquable. En revanche, cette composition génétique n'est pas aléatoire en raison de la liaison génétique : les lignées tendent à porter, à deux locus très liés, des allèles de même origine parentale. L'un des jeux les plus utilisés comporte 26 lignées notées BXD1 à BXD32, issues d'un croisement entre les lignées C57BL/6J (B) et DBA/2J (D)

Chaque lignée RIS est une lignée consanguine, de sorte que l'on peut établir avec précision son phénotype en analysant plusieurs individus mâles et femelles, ce qui permet de réduire les effets environnementaux et les variabilités de mesure. De plus ces lignées peuvent être utilisées pour analyser et comparer plusieurs phénotypes, pour étudier les interactions gène/environnement. Enfin le dernier avantage est que toutes les données obtenues, sur le même jeu de lignées, par différents laboratoires (données de génotypage, de phénotypage et d'expression de gènes) sont cumulables. Elles sont d'ailleurs accessibles sur des bases de données sur internet. La précision de la localisation d'un QTL à l'aide de RIS dépend du nombre de lignées analysées, comme le nombre de descendants dans le cadre d'un croisement en deux générations. En revanche, à l'inverse des croisements en deux générations dans lesquels on décide *a priori* du nombre d'animaux que l'on va analyser (et que l'on peut augmenter à tout moment), chaque jeu de lignées recombinantes consanguines comporte un nombre donné de lignées (en créer de nouvelles prend au moins 5 ans). Enfin, l'étude de la relation dominance/récessivité entre les allèles à un même locus suppose de faire des croisements supplémentaires, ce qui n'est pas le cas dans une F2 qui comporte des animaux appartenant aux trois classes de génotypes à chaque locus marqueur.

La communauté scientifique dispose actuellement d'une dizaine de jeu de lignées recombinantes consanguines chez la souris. Le jeu initial de 26 BXD produit par Benjamin Taylor a été récemment augmenté et compte actuellement plus d'une centaine de lignées. Il existe aussi d'autres jeux de lignées comme AXB (A/J x C57BL/6), CXB (BALB/c x C57BL/6) ou bien SM/J x LG/J de J.Cheverud.

A titre d'exemple, Abdeltawab NF et coll. ont utilisés un jeu de 30 lignées RIS BXD pour identifier des QTL contrôlant la vulnérabilité à *Streptococcus pyogenes* (Abdeltawab *et al.*, 2008). Ces différentes lignées ont été phénotypées pour trois caractères : l'indice de survie (calculé en fonction de la perte de poids et de la mortalité des individus afin de mesurer les différents phénotypes sur le même individu), la bactériémie et la charge bactérienne dans la rate 24h post-inoculation de  $10^7$  ufc de *Streptococcus pyogenes* par voie intraveineuse. Pour chacune des 30 lignées testées, entre 5 et 26 souris ont été phénotypées pour ces différents caractères. L'analyse a mis en évidence un QTL commun pour les trois caractères mesurés, sur le chromosome 2. Pour tenter de réduire l'intervalle de confiance, d'autres lignées BXD non utilisées dans la première étude et possédant des points de recombinaisons différents sur chromosome 2 ont été testées. Ces différentes lignées ont permis de mettre en évidence qu'il n'y avait pas un seul mais deux QTL localisés sur le même chromosome ne contrôlant pas les mêmes phénotypes. Le premier est situé entre 23 et 33 Mb (à partir du centromère) et contrôle la sensibilité, l'allèle D étant dominant. Le second situé entre 125 et 150 Mb et contrôle la bactériémie. Cette étude montre bien l'intérêt de disposer d'un grand nombre de lignée pour cartographier finement un QTL. Si les auteurs n'avaient pas utilisé de lignées recombinantes pour les différentes régions du chromosome 2, ils n'auraient pas identifié ces locus distincts et des intervalles de confiance aussi petits qui contrôlent deux caractères différents, à moins de produire de lignées sous-congéniques (voir paragraphe 1.2.5.)

Il est intéressant de noter que les lignées parentales présentaient des phénotypes assez proches : la lignée DBA/2J montrait un indice de survie très faible (très « sensible »), une bactériémie quasi-nulle et une charge bactérienne dans la rate très élevée alors que la lignée C57BL/6J avait un indice de survie faible, une bactériémie quasi-nulle et une charge bactérienne dans la rate très faible. L'observation de phénotypes beaucoup plus variés dans les collections de RIS testées montre qu'en mélangeant le génome de deux lignées parentales, il a été créé de nouvelles associations alléliques inédites qui permettront d'identifier de nouveaux gènes de résistance.

#### 1.2.4.4.3. Lignées recombinantes congéniques

Lorsqu'un caractère est contrôlé par plusieurs QTL, chaque lignée RIS porte les allèles d'une des deux lignées parentales en moyenne pour la moitié de ces QTL, ce qui rend difficile d'établir les effets individuels de chaque QTL, surtout lorsque certains sont liés par des interactions épistatiques. Pour résoudre cette difficulté, Peter Demant et coll. ont proposé de

développer des lignées recombinantes congéniques (*Recombinant Congenic Strains* ou RCS) qui diffèrent des lignées RIS par la proportion de chaque lignée parentale (Demant & Hart, 1986). Les RCS sont produites à partir d'individus de 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, voire 5<sup>ème</sup> génération de croisement en retour d'une lignée « donneuse » sur une lignée « receveuse ». Ce nombre de génération détermine le pourcentage de génome de la lignée donneuse : il est de 12,5% pour les lignées produites par croisements consanguins entre les individus de 3<sup>ème</sup> génération, et divisé par deux à chaque croisement en retour supplémentaire. Ainsi, il est possible d'isoler les différents QTL dans les RCS distinctes, et de mettre en évidence plus efficacement des relations épistatiques entre QTL. Comme pour les RIS, le nombre de RCS détermine la puissance de détection du QTL mais conditionne aussi le pourcentage du génome couvert par le jeu. Ainsi 20 lignées de 12,5% permettent de couvrir environ 93% du génome de la lignée donneuse.

Les RCS ont montré leur puissance et leur efficacité, en particulier dans différents modèles de cancérogénèse (Demant, 1992) et dans le cadre des maladies infectieuses.

Des études faites par Vidal S et coll. ont mis en évidence le rôle majeur du gène *Nramp1* dans la résistance à une infection par *S. typhimurium* (Vidal *et al.*, 1995). Mais ce gène ne contrôle qu'une partie de la différence de phénotype et d'autres gènes, à effet plus faible, restent à identifier. C'est pour cela que Roy et coll. ont choisi d'utiliser deux jeux de lignées RCS créés entre les lignées A/J et C57BL/6J : AcB et BcA. Les souris C57BL/6J portent un allèle non fonctionnel pour le gène *Nramp1* contrairement à la lignée A/J {Roy, 2006 #50}. Les lignées A/J et C57BL/6J diffèrent pour leur sensibilité : la lignée C57BL/6J est très sensible en terme de mortalité tandis que la lignée A/J est plus résistante (mortalité plus tardive). Trente-six lignées AcB/BcA ont été phénotypées pour différents caractères : la mortalité, la charge bactérienne dans le foie et la rate 4 jours post-inoculation de 10<sup>3</sup> ufc de *S. typhimurium* par voie intraveineuse. La lignée AcB61 meurt précocement comme la lignée parentale C57BL/6J, et a une charge bactérienne dans le foie et la rate intermédiaire entre les deux lignées parentales. En revanche, la lignée AcB64 montre une survie supérieure à la lignée A/J, ainsi qu'une charge bactérienne dans les deux organes étudiés identiques à la lignée A/J. Ces deux lignées ont donc été utilisées, indépendamment l'une de l'autre pour produire des individus F2.

La lignée AcB61 a été croisée avec des individus 129S6/SvEvTac qui sont résistants pour produire 247 individus (AcB61 x 126S6)F2 pour lesquelles le jour de mort a été relevé quotidiennement. L'analyse de cette population a permis de mettre en évidence deux QTL sur les chromosomes 2 appelé *Ity5* (LOD score = 5,4 ; intervalle de confiance entre 155,5 et 180Mb) et 3

appelé *Ity4* (LOD score = 27,3 ; intervalle de confiance entre 65,7 et 124,3 Mb). La part de la variance expliquée est de 42,1% pour *Ity4* et de 7,5% pour *Ity5*. La lignée AcB64 montre un taux de survie important. Ces souris ont été croisés avec des individus DBA/2J (sensibles) pour obtenir 249 (AcB64 x DBA/2J)F2. L'analyse de ces animaux a permis de mettre en évidence 3 QTL : *Ity6* sur le chromosome 14, *Ity7* sur le chromosome 7 et *Ity8* sur le chromosome 15. Aucune interaction épistatique n'a été identifiée entre ces trois locus qui agissent sur le taux de survie. Ces travaux ont permis d'identifier de nouvelles régions chromosomiques impliquées dans la résistance à une infection par *S. typhimurium* en s'affranchissant de l'effet de *Nramp1*. Après avoir identifié les lignées RCS AcB61 et 64, un croisement en deux générations non pas avec les lignées parentales du jeu AcB mais avec une autre lignée consanguine présentant un phénotype opposé à celui observé dans la lignée RCS. L'introduction d'une nouvelle lignée consanguine augmente le polymorphisme contenu dans le croisement et maximise les chances d'identifier des QTL.

Le phénotypage d'un jeu complet de lignée RCS permet dans un premier temps de screener l'ensemble du génome. Si une des lignées montre une différence phénotypique intéressante, des croisements en deux générations sont faits dans le but d'identifier les régions chromosomiques responsables. Une fois identifiées, les régions d'intérêt peuvent être isolées dans des lignées congéniques pour confirmer le QTL.

#### 1.2.4.4.4. Lignées consomiques (ou chromosome substitution strains)

Une lignée consomique (*Chromosome Substitution Strain* ou CSS) (Nadeau *et al.*, 2000) porte un chromosome entier et un seul du génome donneur sur le fonds génétique du génome receveur. Une collection complète comporte donc 21 lignées chez la souris (19 autosomes, chromosome X, chromosome Y). Ces lignées peuvent être utilisées pour screener l'ensemble du génome, au même titre que les lignées RCS ou RIS dans le but d'identifier des différences phénotypiques avec la lignée receveuse pour un caractère donné. L'avantage de ces lignées, contrairement aux lignées RIS ou RCS, est qu'il n'est pas nécessaire de faire les différents croisements. En effet, les lignées RIS et RCS possèdent des segments chromosomiques à différents endroits du génome, il faut donc faire des croisements en deux générations pour identifier lequel (ou lesquels) est responsable de cette différence phénotypique. Avec les lignées consomiques, on identifie en une seule étape le chromosome d'intérêt. Il faut alors réduire la région en produisant des souris recombinantes dans un croisement en retour ou une F2 avec la lignée receveuse.

Les lignées consanguines peuvent aussi être utilisées en seconde intention pour obtenir rapidement des souris congéniques pour des régions chromosomiques identifiées préalablement à l'aide des différentes possibilités décrites dans les parties ci-dessus.

Les premières lignées ont été développées sur le chromosome Y pour étudier son rôle dans l'auto-immunité (Hudgins *et al.*, 1985). Joseph Nadeau a notamment développé cette approche pour cartographier les QTL impliqués dans la vulnérabilité aux tumeurs testiculaires (Matin *et al.*, 1999) mais aucun jeu complet n'a été utilisé pour identifier des locus impliqués dans la vulnérabilité aux maladies infectieuses. Il existe actuellement 3 jeux de lignées : A/J x C57BL/6 (2 jeux réciproques), B6 x PWD et B6 x MSM.

#### 1.2.4.4.5. Cartographie d'association

Une nouvelle stratégie a été proposée en 2005 pour tirer parti du polymorphisme génétique et phénotypique des dizaines de lignées consanguines de souris disponibles. Cette stratégie, appelé *Haplotype Association Mapping* (HAM) consiste à phénotyper précisément plusieurs dizaines de lignées couvrant une assez large diversité génétique et de comparer les phénotypes observés aux génotypes connus pour des marqueurs génotypiques répartis tout le long du génome. Avec le reséquençage du génome de nombreuses lignées de laboratoire, les génotypes sont déjà connus pour plusieurs milliers, voire plusieurs millions de SNP, ce qui évite tout un travail de génotypage et fournit une résolution maximale. L'HAM repose sur l'hypothèse que la plupart des lignées de laboratoire partagent des allèles hérités d'un ancêtre commun, par identité par descendance. Ces associations entre des différences phénotypiques et alléliques peuvent permettre rapidement d'identifier des QTL, sans avoir besoin de produire des croisements (au moins en première intention) et avec une très bonne résolution (en principe corrélée au nombre de lignées analysées).

Cette stratégie ne devrait pas tarder à être mise à profit pour l'étude des maladies infectieuses en raison de ses performances.

#### 1.2.4.4.6. Collaborative cross

Plusieurs groupes se sont réunis en 2004 dans le *Complex Trait Consortium* (CTC) (Churchill *et al.*, 2004) pour mettre en route un grand projet scientifique appelé le Collaborative Cross (CC). L'objectif est d'exploiter à l'extrême le principe des lignées recombinantes consanguines en créant une collection de 1 000 lignées dérivées de 8 lignées. Cinq d'entre elles

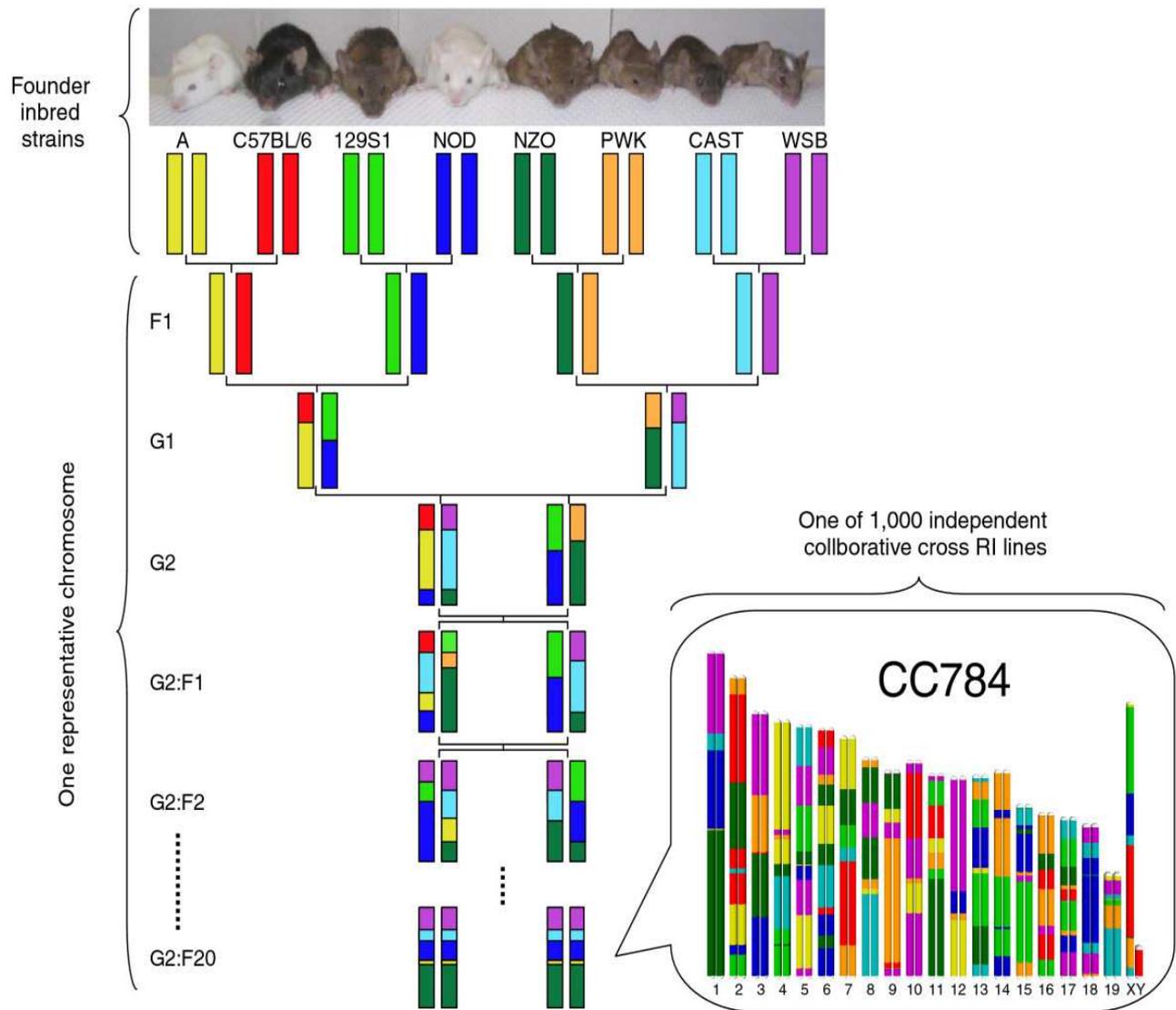
sont des lignées de laboratoire (A/J, C57BL/6J, 129/SvImJ, NOD/LtJ, NZO) et les 3 autres sont des lignées consanguines dérivées des sous-espèces, de *M. m. musculus* (PWK/Ph), *M. m. domesticus* (WSB/Ei) et *M. castaneus* (CAST/Ei). Le principe d'établissement de ces lignées est représenté par la figure 4. Entre les 8 lignées parentales (notées A, B, C, D, E, F, G, H) les 56 combinaisons de F1 possibles (AB, AC, ..., FH, GH et leurs réciproques). Le croisement suivant se fait entre les allèles disjoints par exemple entre ABCD X EFGH (et non pas ABCD X ABDE). La génération des croisements ultérieurs a été réalisée de façon aléatoire. Des simulations ont été réalisées sur la puissance de détection des QTL à l'aide du Collaborative Cross comparé aux HS et aux Advanced Inbred Lines ou bien aux croisements de deuxième génération (Valdar *et al.*, 2006). Ces simulations mettent en évidence une puissance de détection des QTL inférieure à 2 Mb. Actuellement, les croisements sont à la génération F3/F14. Plus de 900 lignées sont en cours de production et quelques données préliminaires suggèrent que, par leur diversité génétique et leur résolution, elles constitueraient un outil très puissant pour l'analyse de caractères complexes, y compris dans le domaine des maladies infectieuses.

#### 1.2.5. Lignées congéniques et sous congéniques

Après avoir identifié une région chromosomique candidate à l'aide des différentes possibilités présentées ci-dessus (croisement en deux générations, utilisation de lignées recombinantes congéniques, consanguines, consomiques, ...), l'étape suivante consiste à 1) confirmer l'existence du QTL identifié et 2) de préciser plus finement la position du QTL.

Pour confirmer la (ou les) région(s) chromosomique(s) identifiée(s) grâce à l'analyse QTL, il est nécessaire de produire des lignées congéniques. Pour cela, des croisements sont effectués entre les deux lignées parentales dans le but d'introduire la région chromosomique d'intérêt de la lignée « A » dans le fonds génétique de la lignée « B ». Des croisements en retour sont effectués pendant 10 générations. A partir de la seconde génération, seuls les animaux possédant le fragment d'intérêt sont mis en accouplement (après génotypage). Ces animaux sont par la suite phénotypés et permettent de confirmer (ou non) l'effet de la région chromosomique sur le phénotype.

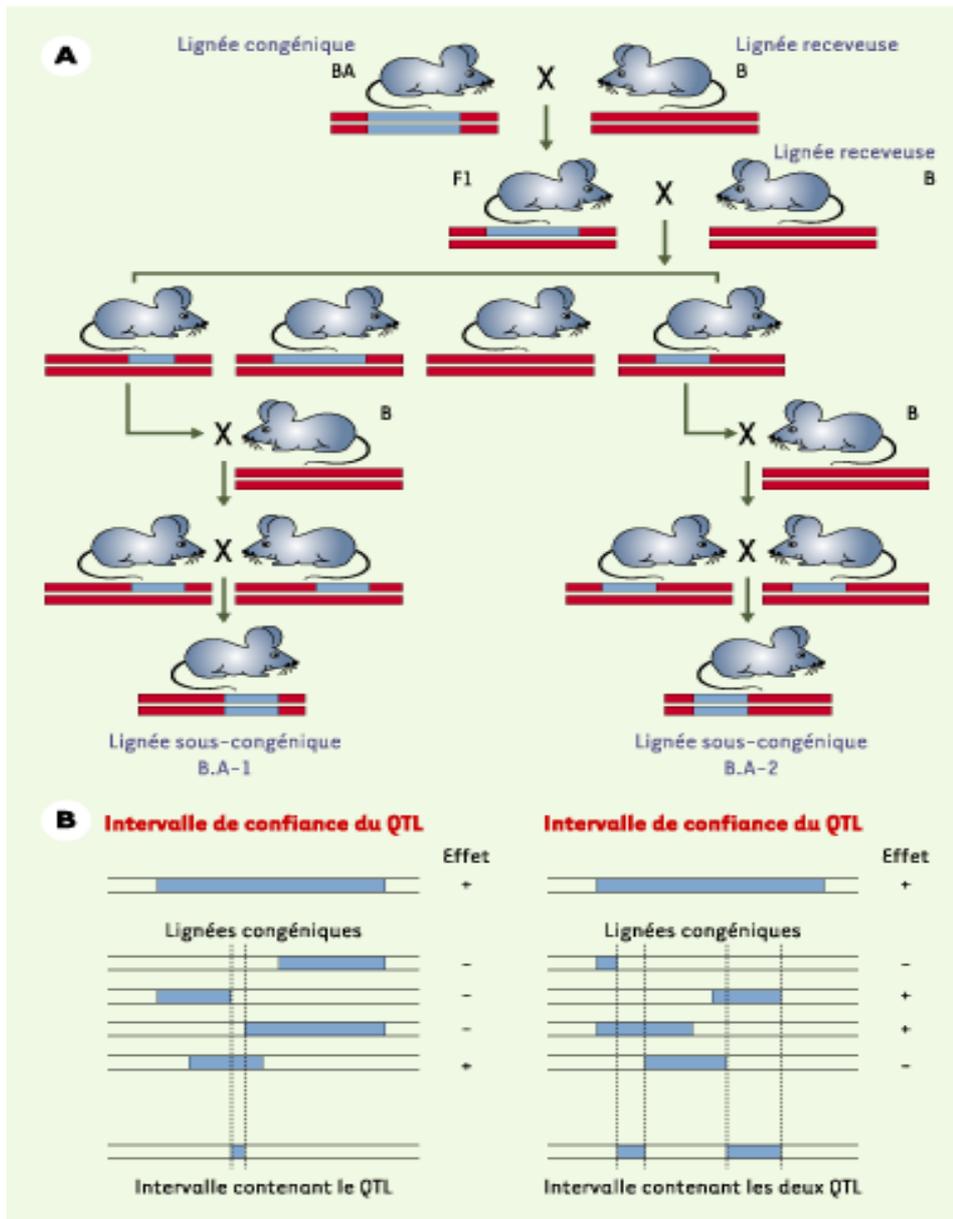
Par la suite, pour affiner la localisation du QTL, il est possible de développer plusieurs lignées sous-congéniques dont les segments transférés sont plus petits et partiellement chevauchants, à la façon dont on construit un contig (cf. figure 5). En comparant le phénotype observé pour les différentes lignées, on peut assigner le QTL à une région très petite. On peut également révéler la présence de deux QTL liés (dans deux sous-intervalles distincts) et



**Figure 4 : Schéma de croisement du Collaborative Cross.**

Entre les lignées parentales, toutes les combinaisons de F1 possibles ont été réalisées ( $7 \times 8 = 56$  possibilités). Le croisement suivant se fait entre F1 issus de lignées parentales différentes, de même pour la génération G3. Les croisements ultérieurs sont réalisés de façon aléatoire. Des simulations montrent (Valdar et al., 2006) que ce croisement devrait permettre d'atteindre une résolution de cartographie des QTL inférieure à 2 Mb.

(d'après Pomp et Mohlke, 2008).



**Figure 5 :Utilisation de lignées sous-congéniques pour affiner la localisation d'un QTL.**

**A:** À partir d'une lignée congénique porteuse d'un grand segment chromosomique, on dérive plusieurs lignées sous-congéniques portant des segments partiellement chevauchants. La lignée congénique (BA) est croisée deux fois avec la lignée receveuse pour produire une population de quelques dizaines d'individus qui sont génotypés pour des marqueurs couvrant le segment initial. Les événements de recombinaison chez le parent F1 produisent des chromosomes contenant un segment congénique plus court. Les individus qui les portent sont accouplés avec la lignée receveuse et leurs descendants hétérozygotes pour le même segment sont croisés entre eux pour obtenir une lignée sous-congénique homozygote.

**B:** L'étude de lignées sous-congéniques permet de confirmer les résultats d'une analyse QTL effectuée sur un croisement, en comparant la composition génétique de chaque lignée avec ses propriétés pour le caractère étudié (« Effet »). À gauche : les résultats permettent de confirmer l'existence d'un QTL et de réduire l'intervalle dans lequel il doit être recherché. À droite : l'analyse des lignées montre que l'intervalle défini initialement contient en réalité deux QTL liés combinant leurs effets (aucun sous-intervalle ne permettant à lui seul d'expliquer l'ensemble des résultats) qui ont pu être isolés dans deux lignées sous-congéniques.

(d'après Montagutelli et Abitbol, 2004)

démontrer que le pic de LOD score observé dans le croisement correspond à la combinaison de leurs effets.

Que le caractère soit monogénique ou polygénique, les souris congéniques permettent de confirmer les intervalles obtenus mais aussi les interactions entre les différentes régions identifiées dans le cas d'un caractère polygénique.

Mashimo T et coll. ont montré que la vulnérabilité au virus West Nile (WNV) différait entre les lignées dites de laboratoire (C57BL/6J ou BALB/c, sensibles) et les lignées dites sauvages (MAI/Pas ou MBT/Pas, résistantes) (Mashimo *et al.*, 2002). A partir de ces observations, 4 croisements en retour ont été entrepris entre ces différentes lignées et ont permis de mettre en évidence un seul locus situé sur le chromosome 5 (appelé *West nile virus* ou *Wnv*) qui contrôlait la mort des individus après une inoculation de 1000 ffu de WNV par voie intra-péritonéale. Des souris congéniques ont été produites entre les lignées BALB/c et MBT/Pas (*Wnv* d'origine MBT/Pas transféré dans un fonds génétique d'origine BALB/c). Ce virus provoquant une encéphalite, les lignées parentales ont été testées par une inoculation intra crânienne qui a confirmé les résultats obtenus par la voie intra péritonéale. Les souris congéniques ont été inoculées avec 1000 pfu de WNV et ont résisté à l'infection, ce confirmant la localisation du locus *Wnv* identifié grâce aux différents croisements en retour. Afin de réduire l'intervalle, des souris recombinantes ont été produites et analysées ce qui a permis de réduire l'intervalle de confiance à 0,4 cM. L'intervalle étant petit, les gènes présents à l'intérieur ont pu être plus facilement analysés et en fonction de leur pertinence par rapport à la maladie. Un cluster de gène codant différentes protéines impliquées dans la voie interféron a été identifié. Le séquençage de ces différents gènes a permis de mettre en évidence pour l'un d'entre eux, *Oasl2*, la présence d'un codon stop au sein de la séquence codante induisant la production d'une protéine tronquée et non fonctionnelle pour l'allèle BALB/c.

Une analyse QTL faite par Sebastiani G et coll. a permis de mettre en évidence un locus sur la partie distale du chromosome 1, *Ity3* contrôlant la mortalité après une infection par *S. typhimurium* à partir des lignées C57BL/6J (sensibles) et MOLF/Ei (résistantes) (Sebastiani *et al.*, 1998). Ce caractère est multigénique. Le locus *Ity1* (gène *Nramp1*) situé en partie proximale du chromosome 1 contrôle aussi en partie ce phénotype. Des souris congéniques ont été produites en conservant la région d'intérêt d'origine MOLF/Ei *Ity3* mais aussi *Ity1* situé sur le même chromosome dans un fonds génétique d'origine C57BL/6J. L'allèle MOLF/Ei ayant été identifié comme récessif dans la première partie de l'étude, des individus hétérozygotes et homozygotes

MOLF/Ei ont été phénotypés. Les souris B6.MOLF<sup>Ity3B6.MOLF</sup> meurent significativement plus tardivement que les souris C57BL/6J. Le caractère étant récessif pour l'allèle MOLF/Ei, les souris B6.MOLF<sup>Ity3MOLF</sup> meurent significativement plus tardivement que celles hétérozygotes pour cette même région. Ces souris congéniques ont permis de confirmer l'effet du locus identifié lors de l'analyse QTL mais aussi qu'il agit de façon indépendante d'*Ity1*. La charge bactérienne dans la rate a été mesurée 1, 3 et 5 jours post-inoculation de la bactérie. Les souris congéniques, qu'elles soient homozygotes MOLF/Ei ou hétérozygotes, montrent des résultats similaires à ceux obtenus pour la lignée parentale MOLF/Ei. Ces résultats montrent que le locus *Ity3* ne contrôle pas la prolifération de la bactérie dans la rate. En revanche, la présence de la région *Ity1* semble contrôler ce phénotype. L'objectif après avoir confirmé ce QTL est d'identifier le ou les gène(s) responsable de ce phénotype. Le locus *Ity3* est localisé dans une région de 84 Mb riche en gène. En se basant sur leur fonction et sur leur pertinence par rapport à la réponse à *S. typhimurium*, différents gènes présents à l'intérieur de l'intervalle ont été séquencés et l'un d'entre eux *Ncf2* a montré des différences de séquence induisant des changements d'acides aminés dans la protéine. Après avoir vérifié l'expression de ce gène et fait des études fonctionnelles, ils ont pu mettre en évidence que le gène contrôlant ce phénotype est *Ncf2*.

D'autres recherches réalisées par Sissons J et coll. ont montré que l'étude des souris congéniques pouvait mettre en évidence des interactions non détectées lors de l'analyse des croisements en deux générations (Sissons *et al.*, 2009). Des études antérieures ont permis d'identifier deux locus impliqués dans la vulnérabilité à la tuberculose. Le locus *Sst1*, contrôlant la mortalité des individus, a été identifié sur le chromosome 1 (Kramnik *et al.*, 2000) à l'aide de croisements de souris (C3HeB/FeJ x C57BL/6J)F2 inoculés par 10<sup>6</sup> ufc de *M. tuberculosis* par voie intraveineuse. Des souris congéniques réciproques (B6.C3H-*sst1* et C3H.B6-*sst1*) ont été produites et ont présenté un phénotype intermédiaire entre les deux lignées parentales. Par conséquent, d'autres gènes contrôlent aussi ce phénotype. A l'aide des souris congéniques C3H.B6-*sst1*, une population de F2 a été produite avec la lignée C57BL/6J et phénotypée, donc dans un contexte *Sst1* résistant pour identifier les autres régions chromosomiques responsables (Yan *et al.*, 2006). Quatre QTL ont ainsi été identifiés sur les chromosomes 7, 12, 15 et 17. Ces différentes régions, au sein de la population F2 étudiée, semblaient interagir de façon additive. Des souris consomiques C3H.B6-chr7 ont été utilisées pour confirmer l'existence du QTL identifié. Malgré une différence de mortalité significative entre la lignée consomique et la lignée parentale, l'effet observé est moins important que celui estimé à partir de la population F2. Les

auteurs ont mis en évidence, à l'aide des souris bi-congéniques que le QTL du chromosome 7 était dépendant du locus *Sst1*. En analysant des sous phénotypes, ils ont pu mettre en évidence que ces deux locus intervenaient à différentes étapes de l'infection. Le locus *Sst1* agit dans la phase précoce de l'infection et empêche le développement de la nécrose dans les granulomes des poumons. Dans un contexte *Sst1* résistant, le chromosome 7 contrôle la multiplication intracellulaire de la bactérie dans les lésions inflammatoires durant la phase tardive de la maladie. Ces deux locus identifiés à partir du phénotype final de l'infection qu'est la mortalité montrent qu'une fois isolé ils ne sont pas capables de restaurer le phénotype prédit lors de l'analyse de la population F2. Ces deux locus agissent à des étapes différentes au cours de l'infection, qui aboutissent ou non à la mort de l'animal. Cette étude montre bien l'importance d'identifier des sous phénotypes lors de l'étude du processus infectieux et les limites d'un phénotype aussi global que la mort/survie, mais aussi l'intérêt des combinaisons des différentes lignées congéniques pour décortiquer le rôle de chacun des locus dans la chronologie de l'infection.

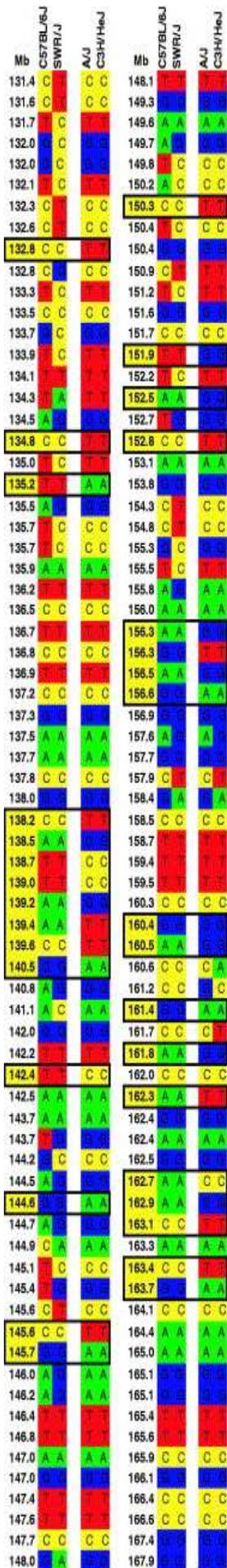
#### 1.2.6. Passer d'une région chromosomique à un gène

La détection de QTL peut et doit s'associer à plusieurs approches complémentaires pour identifier le gène causal. Diverses techniques peuvent être utilisées : la génomique comparative, l'analyse combinée de plusieurs croisements, l'analyse d'haplotypes, la comparaison de séquences et les études d'expression.

L'analyse combinée de plusieurs croisements et l'analyse d'haplotypes sont fondées sur la diversité génétique des lignées de souris.

Dans le cas où plusieurs lignées parentales de souris présentent des différences phénotypiques importantes, plusieurs croisements en deux générations peuvent être effectués. Cette stratégie permet d'augmenter le nombre d'animaux utilisés et donc le nombre de recombinaisons obtenues et, lorsqu'un même QTL ségrége dans plusieurs croisements, de réduire l'intervalle chromosomique commun identifié. Elle permet aussi en combinant les croisements d'identifier des QTL à effet faible qui n'auraient pas pu être identifiés avec l'un ou l'autre des croisements individuellement.

Une autre stratégie pour réduire les intervalles de confiance est *l'interval-specific mapping*. A partir de la région identifiée, bien souvent obtenue par un ou plusieurs croisements en deux générations, il est possible de réduire l'intervalle de confiance en augmentant la densité de marqueurs et en corrélant ces derniers avec le phénotype. En effet, comme montré dans la figure 6, la région QTL identifiée est dans la majorité des cas assez large et contient à la fois des



**Figure 6 : Analyse d'haplotype dans un intervalle chromosomique.**

Un QTL contrôlant la pression artérielle a été identifié dans la même région du chromosome 1, à l'aide de croisements entre C57BL/6 X A et SWR X C3H. Les allèles C57BL/6J et SWR sont associés à une pression artérielle élevée, alors que les allèles A et C3H sont associés à une pression artérielle basse. Les données de SNP pour les quatre lignées de souris ont été utilisées pour réduire l'intervalle de confiance du QTL identifié sur le chromosome 1, en retenant ceux qui sont identiques entre C57BL/6J et SWR d'une part, entre A et C3H d'autre part, et différents entre les deux groupes.

(d'après DiPetrillo K et al., 2005)

marqueurs qui corrélerent avec les phénotypes des lignées étudiées et d'autres non corrélées. Ces régions non corrélées avec le phénotype étudié peuvent par conséquent être exclues de la région d'intérêt car elles ne peuvent pas porter la mutation causale. En revanche, les régions corrélées de façon significative avec le phénotype deviennent d'autant plus intéressante et peuvent permettre de diminuer le nombre de gènes candidats et d'identifier la mutation causale.

Le polymorphisme de séquence génomique affecte l'expression et/ou la fonction d'un gène. Il est par conséquent important, dans une analyse QTL, d'identifier ces polymorphismes pour mettre en évidence le gène causal. A l'heure actuelle, le séquençage du génome de 4 lignées de souris est quasi complet (C57/BL6J, DBA/2J, A/J et 129S1/SvImJ) et 8 autres sont en cours (AKR/J, BALB/cByJ, BTBR T+tf/J, C3H/HeJ, CAST/EiJ, FVB/NJ, MOLF/EiJ, KK/HIJ, NOD/LtJ, NZW/LacJ, PWD/PhJ et WSB/EiJ) via le « projet de reséquençage » réalisé par le National Institute of Environmental Health Sciences.

Marshall KE et coll. ont développé un outil informatique pour identifier les polymorphismes de séquences non synonymes présents dans un intervalle chromosomique donné (Marshall *et al.*, 2002). Cette technique peut aussi permettre l'identification de polymorphisme dans les régions régulatrices des gènes. Cette approche est incontournable pour l'identification du gène causal. Elle peut bien évidemment être combinée aux méthodes utilisées pour réduire les intervalles.

Les risques majeurs de cette approche sont les éventuelles erreurs de séquence. Si une mutation est identifiée par cette approche, il est particulièrement recommandé de reséquencer le gène pour confirmer cette observation. A contrario, ne pas identifier de modification de séquence par cette analyse n'est pas une preuve qu'aucune mutation causale n'est présente.

Un polymorphisme génétique peut affecter à la fois la fonction d'un gène mais aussi son expression. C'est pour cela que l'étude de l'expression est devenue une méthode complémentaire très utilisée pour identifier des gènes dans un intervalle chromosomique défini. Le but est d'identifier des gènes différenciellement exprimés entre les lignées. Le choix de l'organe ou du type cellulaire utilisé est très important : organes cibles au cours de l'infection, type cellulaire impliqué dans la réponse immunitaire mise en place pour lutter contre le pathogène (par exemple les macrophages), etc ...

Les gènes à la fois différenciellement exprimés et ayant une localisation chromosomique correspondant aux intervalles de confiance des QTL pourront alors être considérés comme de bons candidats.

Cette technique peut être appliquée soit entre les lignées parentales utilisées, soit entre la lignée congénique produite et la lignée constituant le fonds génétique de cette dernière. Cette seconde approche permet de cibler de façon plus directe les différences d'expression dans les intervalles d'intérêt.

Pour illustrer ces différentes approches, nous prendrons deux exemples ayant permis de caractériser le gène causal dans le cadre d'études sur les maladies infectieuses :

La première étude porte sur l'identification d'un gène responsable de résistance à *Bacillus anthracis*, une bactérie Gram-positif responsable de la maladie du charbon. Cette bactérie produit de nombreux facteurs solubles comprenant notamment la toxine létale appelée LeTx. Cette toxine, qui induit la nécrose, est très toxique pour les macrophages et cause une mort rapide dans le cas d'une infection systémique. Les lignées de souris consanguines diffèrent toutefois pour leur sensibilité à la toxine LeTx. Les lignées AKR/J, C57BL/6J, A/J, P/J, NOD/LtJ et SJL/J sont résistantes tandis que les lignées BALB/cJ, C3H/HeJ, CBA/J, FVB/NJ, SWR/J et NON/LtJ sont sensibles. Les macrophages issus de la lignée C3H sont lysés par une concentration de toxine 100 000 fois inférieure à celle qui est nécessaire pour la lignée A/J. Des études ont été faites pour identifier les QTL responsables de ce phénotype à l'aide de lignées RIS comme BXH et AKXL mais aussi de (B6 x C3H)B6 BC. Ces divers croisements ont permis de mettre en évidence que la réponse à LeTx est contrôlée par un seul locus, appelé *Ltxs1*, localisé sur le chromosome 11 (Roberts *et al.*, 1998). A l'aide d'une cartographie à haute densité de la région chromosomique ainsi qu'une cartographie physique, l'intervalle de confiance a été réduit pour atteindre un petit fragment de 0,51 cM contenant 14 gènes connus et 5 séquences non annotées (Watters & Dietrich, 2001).

Boyden ED et Dietrich WF (2006) ont mis en évidence le rôle du gène de la famille des NOD Like Receptor (NLR) appelé *Nalp1b* dans l'effet de *Ltxs1*. *Nalp1b* fait partie d'un cluster de gènes contenant 3 gènes paralogues (*Nalp1a*, *b* et *c*) (Boyden & Dietrich, 2006). Une étude de transcription faite sur des macrophages de la lignée 129S1 (sensible) a montré que parmi ces trois gènes, seul le *Nalp1b* est transcrit dans cette lignée. Ce gène a par la suite été séquencé dans 18 lignées de souris, dont le phénotype était connu, et quatre allèles ont été identifiés. Les lignées

sensibles portent toutes le même allèle (allèle 1) tandis que les lignées résistantes portent 3 allèles différents (allèle 2, 3 et 4).

La confirmation du rôle du gène *Nalp1b* repose sur deux résultats expérimentaux : 1) une souris résistante dans laquelle l'allèle sensible a été introduit par transgénèse a montré un phénotype sensible après inoculation de la toxine, 2) le traitement de souris 129SI (sensibles) avec des oligonucléotides antisens dirigés contre *Nalp1b* augmente la résistance (Boyden & Dietrich, 2006). L'activation du signal de *Nalp1b* par LeTx dans les macrophages des lignées sensibles implique l'expression de *casp1*. Des macrophages de souris 129S1 portant l'allèle nul pour le gène *Casp1* deviennent résistantes à la lyse cellulaire provoquée par LeTx. Ces résultats suggèrent que la cytotoxicité de LeTx chez les lignées sensibles résulte de l'action de la toxine intracellulaire sur *Nalp1b* qui aboutit à l'activation de la *caspase1* et l'induction de la mort cellulaire.

La complémentarité des approches disponibles chez la souris a également permis d'identifier des gènes dans le cas de caractères polygéniques, comme le montre l'exemple des locus *Char4* et *Char9* impliqués dans la résistance au paludisme causé par *Plasmodium chabaudi*.

L'infection de la souris par *Plasmodium chabaudi* mime plusieurs caractéristiques physiopathologiques des infections humaines à *Plasmodium falciparum* telle que la parasitémie dans le sang, la réponse de l'hôte, le contrôle génétique de la parasitémie mais aussi l'aboutissement de la maladie qui peut être la mort de l'individu. En utilisant comme phénotype la charge parasitaire au pic de l'infection, Fortin et coll. ont montré des différences phénotypiques entre les lignées C57BL/6J, résistante, et les lignées A/J, SJL et C3H/HeJ, sensibles à la réplication du parasite dans le sang (Fortin *et al.*, 2002). La sensibilité est liée à la fois à des modifications de la réponse inflammatoire mais aussi à une baisse de la réponse érythropoïétique qui réduit le temps de survie. L'analyse de plusieurs croisements entre les différentes lignées résistante et sensibles en utilisant le parasitémie au pic de l'infection mais aussi la mortalité a permis d'identifier trois locus appelé *Char1* (chromosome 9), *Char2* (chromosome 8) et *Char3* (chromosome 17, région H-2). D'autres études utilisant un jeu de lignées RCS ont permis de montrer que les lignées AcB55 et AcB61 étaient résistantes à l'infection alors qu'elles portent l'allèle A/J (sensibles) pour les locus *Char1* et *Char2*. L'analyse d'un croisement (AcB55 x A/J)F2 a permis de mettre en évidence un nouveau locus appelé *Char4* localisé sur le chromosome 3 qui contrôle la parasitémie au cours de l'infection. La

caractérisation phénotypique des deux lignées RCS a permis de montrer que la résistance au paludisme était associée à une splénomégalie, une réticulocytose, un nombre élevé de cellules Ter119+ dans la moelle osseuse ce qui suggère une activité érythropoïétique accrue (Min-Oo *et al.*, 2004). Parmi les gènes situés dans l'intervalle de confiance de *Char4*, le gène codant une pyruvate kinase spécifique des hématies et du foie, *Pklr*, semblait un bon candidat par sa fonction décrite. Il joue en effet un rôle essentiel dans la production d'ATP pour les érythrocytes. Chez l'Homme, une mutation dans ce gène est associée à un phénotype d'anémie hémolytique. Le séquençage du gène *Pklr* a montré la substitution d'une isoleucine par une asparagine en position 90 de la protéine (I90N) dans les lignées AcB55 et AcB61 qui rend la protéine non fonctionnelle. Cette mutation avait déjà été décrite chez l'Homme (Min-Oo *et al.*, 2003). Une seconde mutation a été identifiée dans le gène *Pklr* en position 338 (G338D) chez la souris CBA/N. Les deux mutations I90N et G338D confèrent une sévère anémie qui réduit les effets de l'infection par *P. chabaudi*.

Au cours du clonage positionnel de *Char4*, l'analyse de liaison faite sur la population (AcB55 x A/J)F2 a mis en évidence un second locus, appelé *Char9*, situé sur un des fragments (de 14 Mb) du chromosome 10 de la lignée AcB55. L'allèle C57BL/6J de ce locus est associé à une réduction de la parasitémie. Il agit de façon codominante, et de façon additive avec *Char4*. Une lignée congénique a été produite à partir de la lignée AcB55. La région chromosomique comprend 77 gènes qui ont été caractérisés par différentes approches : 1) leur niveau d'expression dans des tissus spécifiques, 2) la présence d'altérations spécifiques du niveau d'expression entre allèles sensibles et résistants et 3) le séquençage des régions codantes et des parties régulatrices des gènes pour identifier d'éventuels polymorphismes. Les gènes *Vanin1* (*Vnn1*) et *Vanin3* ont été identifiés, à partir de ces différents critères, comme de bons candidats pour le locus *Char9*. Ils sont tous les deux situés dans des blocs d'haplotype très conservés entre les lignées et leur expression est strictement régulée en *cis* dans un même bloc. Ces gènes codent pour des pantetheinases, un groupe d'enzymes impliquées dans la production de cystéamine qui joue un rôle majeur dans la régulation de la réponse de l'hôte face aux stimuli inflammatoires. L'absence d'ARN messager des gènes *Vnn* et l'absence d'activité pantetheinase dans les tissus (rate et foie) sont associés avec la vulnérabilité au paludisme et semblent être causés par un réarrangement de la région promotrice de *Vnn3*. Une administration de cystéamine *in vivo* diminue la charge parasitaire dans le sang et augmente le taux de survie suite à une infection par *P. chabaudi* (Min-Oo *et al.*, 2007). Ces résultats montrent que les pantetheinases interviennent dans la réponse de l'hôte face au paludisme.

Ces quelques exemples illustrent la complémentarité des différentes approches expérimentales. La diversité des croisements et des lignées utilisées contribuent efficacement à 1) confirmer certains QTL, 2) profiter de la diversité génétique pour réduire les intervalles de confiance, 3) identifier différents allèles associés au phénotype et 4) identifier de nouvelles régions chromosomiques. Après avoir borné de façon précise cet intervalle, les gènes situés à l'intérieur peuvent être étudiés de plus près en fonction des rôles décrits pour chacun d'entre eux et leur possible implication dans le phénotype.

L'un des intérêts principaux des études sur des modèles rongeurs est la possibilité de valider, à l'aide de modifications génétiques (transgénèse, recombinaison homologe, ARN interférence, etc ...), des hypothèses causales formulées sur la base de différences de séquences entre lignées sensibles et résistantes.

#### 1.2.6.1. *Analyses de gènes candidats*

Une fois qu'un gène candidat a été identifié sur la base d'arguments solides, des souris génétiquement modifiées peuvent être produites pour valider définitivement son rôle dans le phénotype observé. Les principaux modèles de modifications génétiques utilisées sont les souris *knock-out* (KO), dans lesquelles le gène est rendu non fonctionnel, les souris *knock-in* (KI) dans lesquelles un allèle est remplacé par un autre, et les souris transgéniques (Tg) qui sur-expriment un nouvel allèle contrôlé par un promoteur défini et inséré de façon aléatoire dans le génome.

Le gène *Ipr1* a été identifié comme étant responsable de la vulnérabilité à *M. tuberculosis*. *Ipr1* est exprimé dans les macrophages et les cellules de l'hôte dans lesquelles la bactérie se réplique. Des souris transgéniques surexprimant le cDNA complet d'*Ipr1* ont été produites dans un fonds génétique sensible (C3HeB/FeJ). Ces souris ont montré une résistance accrue à l'infection et leurs macrophages montrent aussi une résistance importante à l'infection *in vitro* par *M. tuberculosis* mais aussi par *L. monocytogenes*, suggérant que ce gène n'agirait pas de façon spécifique sur la vulnérabilité à un pathogène mais à différentes bactéries intracellulaires (Pan *et al.*, 2005).

Le gène *Nramp1* joue un rôle important dans la résistance à plusieurs bactéries : *M. bovis*, *S. typhimurium* et *L. donovani*. Un changement d'acide aminé en position 169 de la protéine est responsable de cette différence phénotypique : l'allèle dit G169 confère la résistance tandis que l'allèle D169 confère la vulnérabilité.

Deux types de souris génétiquement modifiées ont été produits pour confirmer la fonction de ce gène. La première est une souris KO qui a permis d'analyser le phénotype en l'absence du gène. Les souris *NRAMP1* *-/-* sont sensibles à l'infection contrairement aux souris possédant l'allèle de résistance. Ce résultat permet donc de confirmer que *Nramp1*, jusqu'à présent supposé comme un des meilleurs candidats, est bien l'un des gènes causal majeur pour les locus *Bcg*, *Lsh* et *Ity* (Vidal *et al.*, 1995). Au-delà du phénotype de mortalité, la charge bactérienne dans la rate après inoculation de BCG, est beaucoup importante dans les souris KO. Un second modèle a été produit par Govoni G et coll. qui ont créé une souris transgénique dans laquelle l'allèle G169 a été introduit dans un fonds génétique homozygote D169, donc sensible à l'infection (Govoni *et al.*, 1996). Ces animaux ont été testés avec les différents pathogènes (comme dans l'étude de Vidal S et coll. (Vidal *et al.*, 1995)) et s'avèrent être résistants à l'infection. Ces deux études sont très complémentaires, puisque l'une correspond à un gain de fonction et l'autre à une perte de fonction.

#### 1.2.6.2. Production de nouvelles mutations aléatoires

La production de mutations aléatoires se fait principalement à l'aide d'un agent mutagène chimique appelé éthyl-nitroso-urée (ou ENU). L'ENU induit un taux de mutations élevé avec principalement des changements de bases azotées de type A en T ou A en G, mais peu de cassures chromosomiques. Avec l'utilisation de ce mutagène, l'ensemble du génome d'un organisme peut être touché. Les phénotypes d'intérêt sont recherchés par des cribles phénotypiques appropriés. La recherche de mutations dominantes se fait sur les descendants d'individus ayant subi une mutagénèse, alors que la recherche de mutations récessives nécessite d'établir des « micro-pedigrees » (Richer *et al.*, 2008). Théoriquement, on peut espérer par ce moyen de cribler tous les gènes contrôlant un phénotype. Dans le cas de la résistance de l'hôte aux maladies infectieuses, cet ensemble de gènes a reçu le nom de « résistome » (Marathe *et al.*, 2004).

Actuellement une mutagénèse à l'ENU est en cours dans le groupe de l'Université Mc Gill dirigée par Sylvia Vidal et Danielle Malo pour identifier des mutants présentant des différences de sensibilité après une inoculation de 1000 ufc de *S. typhimurium* par voie intraveineuse. La lignée utilisée pour cette expérience de mutagénèse est la lignée 129S1 qui est résistante à l'infection. Pour identifier les mutations récessives induites par l'ENU, les individus sont testés à la 3<sup>ème</sup> génération (G3). La sensibilité précoce à l'infection a été utilisée comme phénotype pour minimiser les faux positifs : les animaux moribonds ou morts avant le 8<sup>ème</sup> jour

post-inoculation sont considérés comme sensibles. Les familles pour lesquelles des animaux sensibles ont été identifiés dans au moins deux portées font l'objet de croisements de confirmation (Richer *et al.*, 2008).

Pour effectuer la cartographie de ces mutations, des individus issus d'une famille « sensible » sont croisés avec la lignée DBA/2J qui porte des allèles de résistance pour les gènes *Nramp1* et *Tlr4*. Par cette approche, *Ity9* a été identifié sur le chromosome 6. Les gènes, situés dans l'intervalle candidat, vont être étudiés en se basant à la fois sur leur séquence mais aussi sur leur expression dans les macrophages ou d'autres types cellulaires pertinents dans le cadre de l'infection par *S. typhimurium*.

#### 1.2.7. Apport de l'étude de modèles animaux pour les maladies infectieuses de l'Homme

Les modèles murins ont permis d'identifier des gènes impliqués dans la vulnérabilité aux maladies infectieuses. La question se pose alors de leur rôle chez l'Homme. Dans certains cas, un gène identifié chez la souris s'est montré également impliqué dans la résistance à la même maladie chez l'Homme.

Le gène *Nramp1* code pour un transporteur membranaire d'ions présents principalement à la surface des macrophages et mais aussi d'autres types cellulaires. Identifié comme un locus de sensibilité pour différentes souches de *M. bovis* chez la souris, *Nramp1* influence aussi la sensibilité à certaines espèces de *Salmonella* et de *Leishmania*. Chez l'Homme, une étude cas-contrôle sur des cas de tuberculose au sein d'une population Gambienne a permis d'identifier plusieurs polymorphismes dans le gène humain (Bellamy *et al.*, 1998). Ces résultats ont été confirmés dans la majorité des autres études cas-contrôle déjà faites.

Un autre gène, *Ipr1*, identifié comme impliqué dans la résistance à *M. tuberculosis* et confirmé par clonage positionnel, a été caractérisé par Kramnik I et coll. (Kramnik *et al.*, 2000). Le gène *Ipr1* code pour un facteur de transcription qui modifie le type de mort cellulaire des macrophages infectés par la bactérie de la nécrose à l'apoptose.. Il contrôle la prolifération de *M. tuberculosis* mais aussi de *L. monocytogenes* à la fois *in vivo* et *in vitro*. Le gène *SP110* est l'homologue humain du gène *Ipr1* identifié chez la souris. L'étude de cohortes de famille dans 3 régions de l'ouest de l'Afrique a permis de mettre en évidence un changement d'acide aminé dans ce gène associé à la vulnérabilité à la tuberculose (Tosh *et al.*, 2006).

Dernier exemple, le gène *Oas1b* est non fonctionnel dans la plupart des lignées de laboratoire en raison d'une mutation faux sens qui rend ces souris très sensibles au virus West

Nile. Une étude réalisée sur des patients infectés par le WNV hospitalisés à Boston a permis de mettre en évidence une association avec un SNP situé dans l'exon 2 du gène *Oas* qui est l'homologue humain d'*Oas1b* murin (Yakub *et al.*, 2005). Les travaux de Lim JK et coll. (2009) ont confirmé ces résultats en montrant qu'*Oas1* est un facteur de risque important face à l'infection par le WNV chez l'Homme (Lim *et al.*, 2009). L'induction pharmacologique d'*Oas1*, qui a déjà été décrit comme inductible par un traitement via de l'IFN $\alpha$  (Kim *et al.*, 2006; Murashima *et al.*, 2000), pourrait être envisagé comme application thérapeutique pour prévenir d'une infection par WNV chez l'Homme (Lim *et al.*, 2009).

Ces exemples illustrent des situations dans lesquelles des résultats obtenus chez la souris ont pu être directement transposés avec succès chez l'Homme. Dans d'autres cas, l'identification d'un gène chez la souris met en évidence le rôle d'une voie métabolique qui peut être également impliquée chez l'Homme. Ainsi, l'identification du gène *Van3* qui contrôle la parasitémie dans un modèle murin d'infection par *Plasmodium* a montré que la cystéamine permet d'inhiber la croissance de *Plasmodium in vitro* et inhibe la réplication du parasite dans les hématies *in vivo* (Min-Oo *et al.*, 2007). Cette drogue était déjà utilisée chez l'Homme pour d'autres pathologies. Ce sont ces résultats obtenus chez la souris qui ont permis de découvrir cette nouvelle indication thérapeutique.

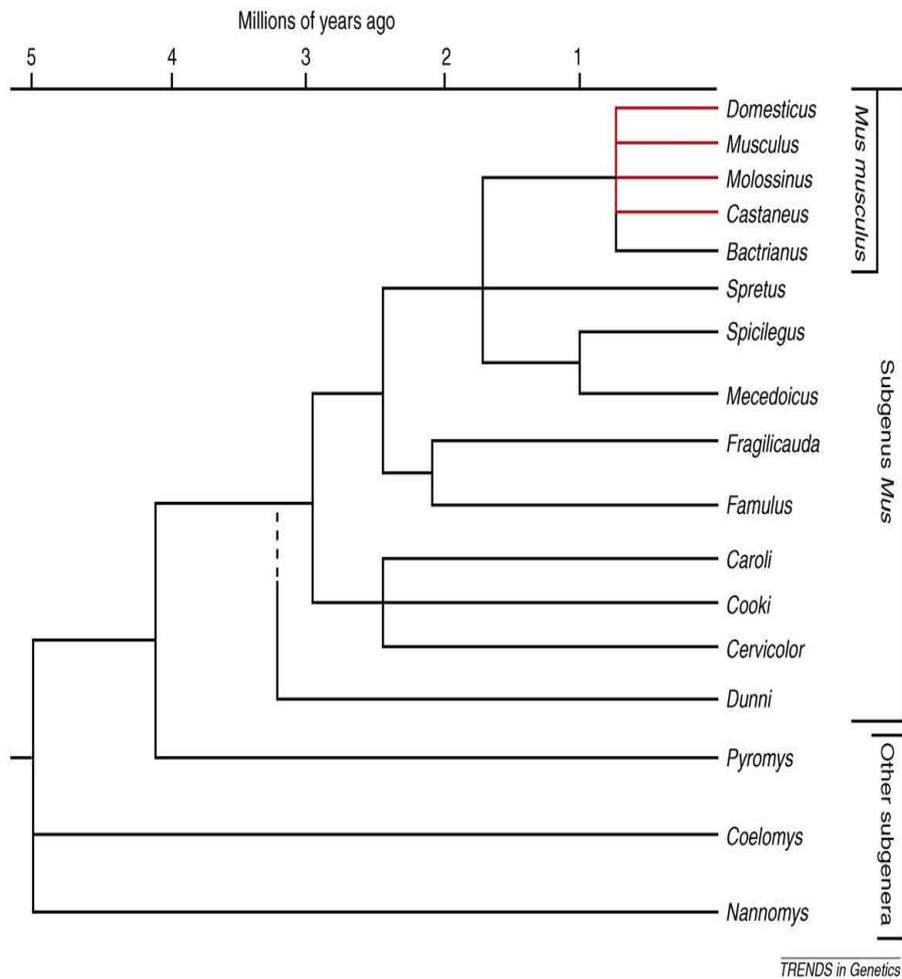
Dans d'autres cas enfin, les données produites sur les modèles murins n'ont pas (ou du moins pas encore) trouvé d'application directe chez l'Homme.

Ces approches murines ont été un succès pour l'identification de gènes de vulnérabilité chez l'Homme car le micro-organisme responsable de la tuberculose chez l'Homme est le même chez la souris contrairement à d'autres pathogènes comme le HIV par exemple (chez la souris, la symptomatologie n'est pas transposable). Ces deux locus touchant la réponse innée et non acquise, il est possible qu'il y ait moins de spécificité hôte/pathogène que pour les gènes du CMH.

### 1.3. Les souris sauvages

#### 1.3.1. Origine et évolution du genre *Mus*

Les souris appartiennent au genre *Mus*. Grâce au travail des évolutionnistes, la taxonomie des différentes espèces de ce genre est désormais bien connue (cf. figure 7) (Guénet & Bonhomme, 2003).



### Figure 7 : Phylogénie du genre *Mus*

L'émergence du genre *Mus* est estimée à environ 5 millions d'années et correspond à la séparation des différents sous genres *Nannomys*, *Coelomys* et *Pyromys*. La séparation des espèces asiatiques (*Mus cervicolor*, *Mus cooki* et *Mus caroli*) est datée de 3 millions d'années. C'est autour de 2 millions d'années que se fait la séparation entre l'espèce indienne *Mus famulus* et la thaïlandaise *Mus fragilicauda*. L'étape suivante se déroule autour de 1,5 millions d'années où se séparent trois espèces partageant des caractéristiques morphologiques : *Mus spretus*, la lignée à queue courte de l'ouest méditerranéen ; *Mus spicilegus*, la lignée bâtisseuse d'Europe centrale et *Mus macedonicus*, la lignée à queue courte de l'est méditerranéen. Les sous-espèces de *Mus musculus* étant à l'origine de l'établissement des souris de laboratoire sont notées en rouge.

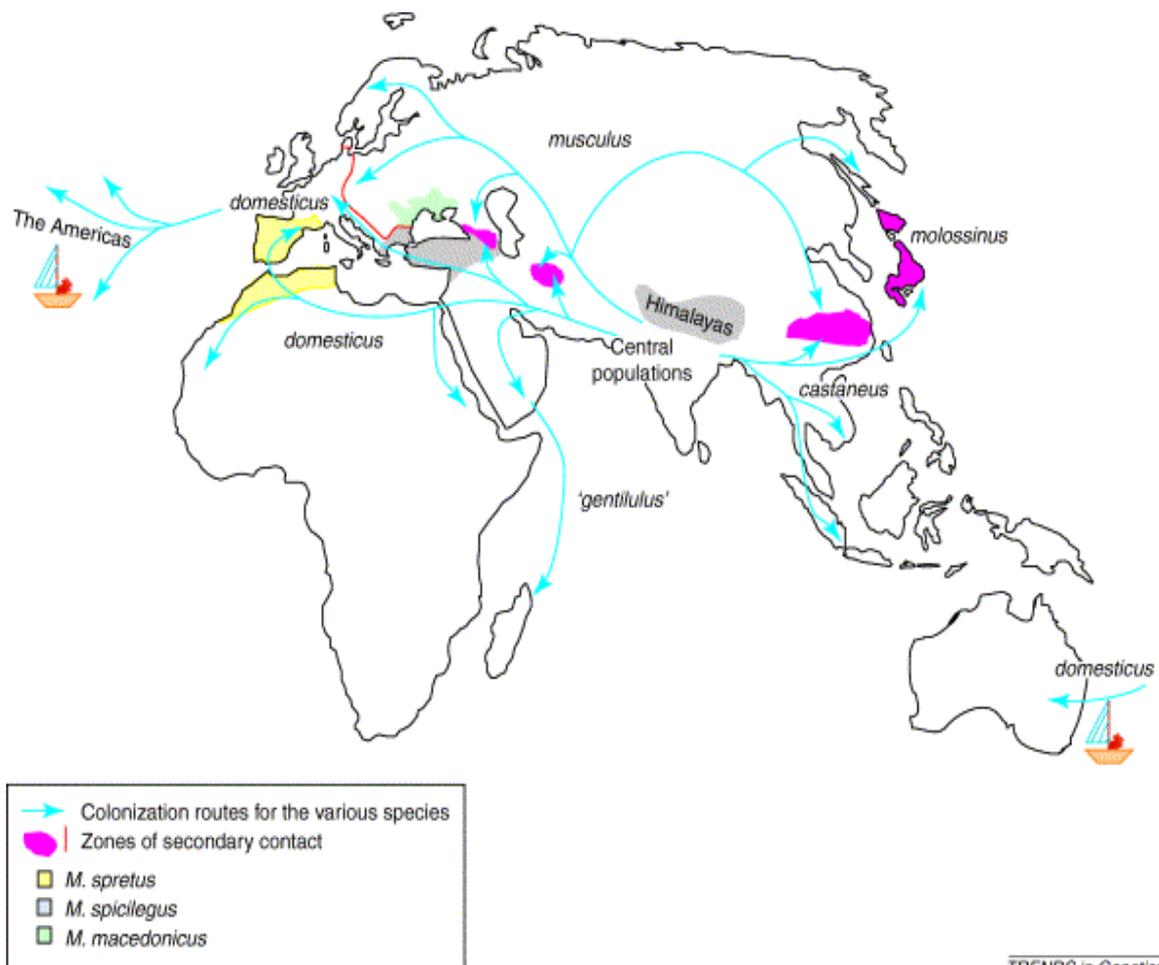
(d'après Guénet JL and Bonhomme F, 2003)

La séparation phylogénique entre les genres *Rattus* et *Mus* est survenue il y a environ 10 millions d'années. Plusieurs espèces sont ensuite apparues et se sont individualisées au sein du genre *Mus*. Elles se distinguent par des différences morphologiques, de répartition géographique, de biotope ou de comportement, et par un isolement reproductif. L'une d'entre elles, *Mus musculus*, originaire du Nord de l'Inde, a donné naissance à plusieurs sous-espèces qui ont progressivement divergé au cours des 250.000 dernières années, à l'occasion de différentes migrations (figure 8). En accompagnant les migrations humaines vers l'Ouest, elle a donné la sous-espèce *M. m. domesticus* implantée en Europe de l'Ouest, en Afrique, puis secondairement en Amérique et en Australie. *M. m. musculus* a colonisé de vastes territoires s'étendant de l'Europe de l'Est au Japon en passant par la Russie et le Nord de la Chine. Enfin, *M. m. castaneus* a conquis l'Asie du Sud-Est (Sri Lanka, Vietnam, Malaisie, etc...). Au Japon est apparue une autre sous-espèce, *M. m. molossinus*, née de l'hybridation entre souris *M. m. musculus* venant du Nord et souris *M. m. castaneus* venant du Sud. Plusieurs autres espèces du genre *Mus* sont retrouvées en Europe. *Mus spretus* occupe une place particulière en ce qu'elle est l'espèce la plus distante sur le plan évolutif du groupe *Mus musculus*, dont elle partage certaines aires géographiques (en particulier dans le Sud-Est de la France), et avec laquelle elle demeure capable de produire des hybrides fertiles, tout au moins au laboratoire.

### 1.3.2. Les lignées de souris de laboratoire

#### 1.3.2.1. *Origine des souris de laboratoire*

Les premiers travaux scientifiques utilisant des souris sont attribués à Robert Hooke, en 1614, et portaient sur une étude de l'oxygène dans les organismes vivants (Morse, 1978). L'histoire des lignées consanguines de laboratoire commence avec celle des collectionneurs japonais qui entretenaient, en particulier durant l'ère Edo, des souris comme animaux de compagnie. Ils avaient accumulé au fil du temps des mutants de coloration de la peau tels que albinos, pink-eye dilution, spotting ou chinchilla. Les anglais ont rapporté en Europe des spécimens à la fin du XIXème siècle à la faveur de leurs activités commerciales avec l'Extrême-Orient. Elles ont alors été croisées avec des souris européennes, à une époque où on ignorait tout ou presque de la diversité des espèces du genre *Mus*. Quelques chercheurs, en Europe et aux Etats-Unis, ont commencé à utiliser des souris pour leurs travaux scientifiques. C'est ainsi que le français Lucien Cuénot rapporta en 1902 que les lois de Mendel s'appliquaient à la souris et par extension aux mammifères (Cuénot, 1902). A cette époque, les souris utilisées provenaient de petits "élevages" artisanaux. Ainsi, Miss Abbie E.C. Lathrop, une institutrice à la retraite



**Figure 8: Distribution géographique des différentes espèces du genre *Mus* et leurs voies de dissémination supposées.**

Les ancêtres des souris sont apparus entre le Moyen-Orient et l'Inde il y a 6 ou 7 millions d'années. Les souris ont progressivement colonisé les différents continents par migration ou en accompagnant les groupes humains. Ces migrations se sont accompagnées d'un isolement qui a abouti à des spéciations et des hybridations.

(D'après Guénet JL et Bonhomme F, 2003).

demeurant dans le Massachusetts a croisé des souris de diverses provenances, en particulier d'Europe, afin d'en faire commerce. Ces souris, dont certaines développaient spontanément des tumeurs, ont servi de progéniteurs pour les premières lignées consanguines de laboratoire (Morse, 1978). Les premiers généticiens de la souris se sont ensuite échangés leurs lignées et les ont croisées entre elles pour obtenir de nouvelles caractéristiques. Un siècle plus tard, plusieurs centaines de lignées ont ainsi été développées et offrent aux généticiens une grande diversité de phénotypes.

Le rappel de ces éléments historiques suggère que le génome des souris de laboratoire est un hybride artificiel entre les trois sous-espèces *M. m. domesticus*, *M. m. musculus* et *M. m. castaneus* (Bonhomme & Guénet, 1987).

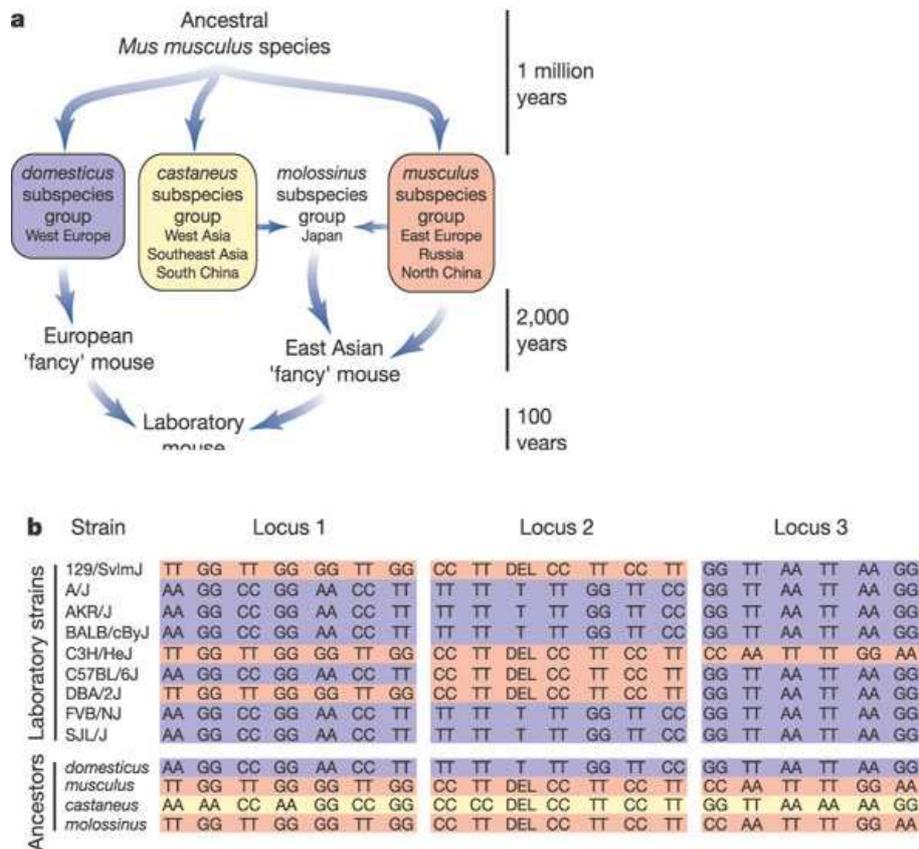
#### 1.3.2.2. *Composition génétique des lignées de souris de laboratoire*

Depuis une vingtaine d'années, différents groupes ont cherché à établir précisément l'origine génétique des différentes régions du génome dans les lignées de laboratoire. L'analyse de marqueurs RFLP (Bishop *et al.*, 1985; Ferris *et al.*, 1982), de la séquence de quelques régions ou du génome entier (Wade *et al.*, 2002) et, plus récemment, du polymorphisme de plus de 8,3 millions de SNPs sur une quinzaine de lignées (Frazer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007), a montré que les lignées de laboratoire ont hérité de l'ADN mitochondrial de *M. m. domesticus* et du chromosome Y de *M. m. musculus*. L'origine des autosomes et du chromosome X est beaucoup plus hétérogène selon les lignées, mais les études les plus récentes ont indiqué qu'en moyenne 90% du génome provient de *M. m. domesticus*, 5 à 7% de *M. m. musculus* et moins de 2% de *M. m. castaneus* (Frazer *et al.*, 2007). Ainsi, les données de séquence confirment-elles bien les données historiques (figure 9).

L'apparement des lignées de laboratoire qui résulte du petit nombre de géniteurs qui ont contribué à leur développement est reflété par l'existence de régions fortement polymorphes entre les lignées (qui représentent environ 1/3 du génome), au milieu d'autres régions qui semblent avoir été conservées pratiquement intactes, avec un taux de polymorphisme très faible (Wade *et al.*, 2002). Ce résultat suggère que les lignées de laboratoire recouvrent une diversité génétique réduite en regard de celle qui existe entre les espèces du genre *Mus*.

#### 1.3.3. Intérêt des souris sauvages

A partir des années 1970, les évolutionnistes ont entrepris de clarifier la définition des différentes espèces et sous-espèces à l'intérieur du genre *Mus*. Ils ont en particulier capturé des



**Figure 9 : Origine mosaïque des souris de laboratoire.**

(a) Les souris de laboratoire sont issues de croisements entre individus appartenant à des sous-espèces Européenne (*domesticus*) et Asiatiques (*musculus*, *castaneus* et *molossinus*). A l'occasion d'échanges commerciaux avec l'Extrême-Orient, des européens ont rapporté des souris *M. m. molossinus* (en particulier porteuses de mutations) qu'ils ont ensuite croisées avec des souris *M. m. domesticus*. Les descendants de ces croisements sont à l'origine des premières lignées de laboratoire.

(b) En comparant, pour une région donnée, un groupe de SNP liés (haplotype) entre une lignée et les différentes espèces ancestrales, on peut établir l'origine spécifique la plus probable. Ainsi, pour le locus 1, les lignées 129/SvImJ, C3H/HeJ et DBA/2J portent un haplotype qui provient des sous-espèces *M. m. musculus* et *molossinus*. La grande similarité haplotypique observée entre lignées de laboratoire découle du petit nombre de progéniteurs sauvages dont elles sont dérivées.

Locus 1 : chromosome 14 @121 Mb. Locus 2 : chromosome6 @139 Mb. Locus 3 : chromosome 2 @107 Mb.

(D'après Wade CM et al., 2002)

individus sauvages dans diverses régions du globe et tenté d'établir des colonies stables au laboratoire. L'analyse de marqueurs génétiques a rapidement mis en évidence l'existence de différences génétiques très importantes entre ces populations et les lignées de laboratoire, et l'existence d'allèles jamais identifiés précédemment. Après souvent de grandes difficultés, des lignées modérément ou complètement consanguines ont pu être produites à partir de géniteurs appartenant à des espèces ou sous-espèces pures (Guénet & Bonhomme, 2003). Ce sont ces lignées que l'on nomme "souris sauvages".

Plusieurs estimations du taux de polymorphisme entre lignées de souris sauvages et lignées de souris de laboratoire ont été publiées. L'analyse de marqueurs microsatellites après électrophorèse dans un gel d'agarose a montré que 80 à 90% d'entre eux présentaient un polymorphisme de taille entre les deux familles de lignées (Montagutelli *et al.*, 1991). Le séquençage à grande échelle de différents génomes de souris a montré qu'une modification de séquence est retrouvée en moyenne tous les 50 à 130 paires de bases (Mahler *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005) et seulement tous les 250 à 300 pb entre lignées de laboratoire (Frazer *et al.*, 2007). On considère que le taux de polymorphisme entre les espèces *M. spretus* et *M. musculus* est du même ordre de grandeur que celui qui existe entre l'Homme et le chimpanzé (Newman *et al.*, 2005).

Ce haut degré de polymorphisme génétique entre les lignées de souris sauvages elles-mêmes, et avec les lignées de souris sauvages et lignées de laboratoire se traduit également par des différences phénotypiques qui sont un moyen inestimable pour identifier de nouveaux gènes. Ceci suppose qu'il soit possible de croiser des lignées de souris sauvages et lignées de souris de laboratoire pour produire un croisement en retour ou une F2, ce qui est généralement le cas.

Les lignées d'origine sauvage sont fréquemment (mais pas toujours) plus résistantes aux infections bactériennes ou virale, voire parasitaires, que les lignées de laboratoire. L'hypothèse avancée pour expliquer cette différence est qu'il existe en milieu naturel une forte pression de sélection en faveur d'allèles impliqués dans la réponse immunitaire innée et/ou adaptative qui procurent un niveau de résistance plus élevé, pression qui n'existe plus dans les populations de souris de laboratoire qui sont élevées dans un environnement microbiologiquement protégé.

Dans certains cas, le degré de résistance à une infection est contrôlé par un locus majeur à effet fort. Par exemple, la majorité des lignées de laboratoire sont sensibles à une infection par virus le *Influenza* (responsable de la grippe) tandis que les souris de la lignée A2G et la plupart des souris d'origine sauvage sont résistantes. Ce caractère est contrôlé principalement par un

gène majeur appelé *Mx1* (*Myxovirus resistance 1*) localisé que le chromosome 16 pour lequel il existe deux allèles : *Mx1*<sup>+</sup> (résistant, dominant) et *Mx1*<sup>-</sup> (sensible, récessif). *Mx1* code pour une protéine de 72 KDa dont la transcription est induite par l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$  peu de temps après l'infection (Vanlaere *et al.*, 2008). L'allèle muté de *Mx1* présente une fréquence élevée dans les lignées de laboratoire.

Un second exemple est celui de la sensibilité au virus West Nile (WNV). Les lignées de laboratoires sont sensibles (à l'exception de la lignée PL/J) à une infection par le WNV tandis que les lignées sauvages sont complètement résistantes. Une étude génétique a montré que ce caractère était contrôlé par un gène majeur dont la localisation fine a montré qu'il s'agit du gène *Oas1b* (Mashimo *et al.*, 2002). D'autres différences majeures de sensibilité à des maladies infectieuses entre souris sauvages et souris de laboratoire ont été exploitées pour identifier des gènes de résistance. Ainsi, Sebastiani et coll. (1998) ont identifié deux locus, *Ity2* et *Ity3*, contrôlant la vulnérabilité à *Salmonella typhimurium* à l'aide de croisements entre les lignées MOLF/Ei et C57BL/6J (Sebastiani *et al.*, 1998).

Alors que la plupart des outils génétiques développés jusqu'à présent pour l'analyse des caractères quantitatifs ont fait appel à diverses combinaisons de souris de laboratoire, plusieurs jeux de lignées recombinantes congéniques ont été produits récemment à partir de croisements intersubspécifiques ou interspécifiques (B6xPWK, B6xMSM, B6xSEG) (Burgio *et al.*, 2007). Le collaborative cross, dont l'objectif est de produire un outil optimisé pour l'analyse des caractères complexes, comporte 3 lignées sauvages parmi les huit lignées parentales pour que ségrége une large collection d'allèles.

Parmi les souris sauvages, l'espèce *Mus spretus* occupe une place particulière car il s'agit d'une espèce distincte de *Mus musculus*, qui présente avec elle un taux de polymorphisme estimé à 1,5% au niveau nucléotidique, comparable à celui qui est observé entre l'homme et le chimpanzé. Une récente revue a fait le bilan des 30 dernières années de travaux réalisés à l'aide de *Mus spretus* (Dejager *et al.*, 2009). Cette espèce présente de nombreuses différences phénotypiques avec la plupart des lignées de laboratoire, telles qu'une résistance plus importante à différents types de cancers : cancer de la peau (Nagase *et al.*, 1995), cancer des poumons (Lynch & Walsh, 1998) et lymphome du thymus (Santos *et al.*, 2002). Grâce à la capacité de ces souris à résister à l'induction de tumeur cutanée par application cutanée de DMBA (7,12-dimethylbenzanthracène), Erwart-Toland et coll. ont pu localiser pour la première fois, grâce à un croisement interspécifique, un variant contrôlant la vulnérabilité au cancer de la peau (Ewart-

Toland *et al.*, 2003). Récemment, ils ont combiné le polymorphisme génétique à une analyse d'expression sur la peau dans un croisement en retour. Ils ont en évidence un profil d'expression clairement différent entre individus résistants et individus sensibles, associé à différents caractères comme l'inflammation, le contrôle du cycle cellulaire et la sensibilité aux tumeurs (Quigley & Balmain, 2009).

A l'heure actuelle, plusieurs lignées d'origine *Mus spretus* sont disponibles. Ces lignées ont été établies à partir de souris capturées dans différentes régions de France, d'Espagne, du Portugal, de Tunisie ou du Maroc. Elles comprennent les lignées SPRET/Ei, SEG/Pas, STF/Pas, SPE/Pas, SPR/Smh, SMZ/M, SFM/M et SPW/T. Ces lignées sont généralement plus petites que les lignées dites de laboratoire et ont un pelage agouti avec le ventre clair (white-bellied agouti). Elles ont aussi la particularité d'avoir conservé un comportement sauvage, c'est-à-dire une capacité à courir vite, à sauter et une tendance spontanée à se cacher dans la litière.

#### 1.3.4. Limites des souris sauvages

Les deux principales difficultés pratiques liées à l'utilisation des souris sauvages découlent de leurs performances zootechniques généralement médiocres. La plupart des lignées sont entretenues dans un seul laboratoire et il est difficile d'obtenir un nombre suffisant d'individus pour faire des études approfondies. Leur élevage requiert des précautions multiples, ces souris n'ayant pas perdu, comme les lignées de laboratoire, leur comportement sauvage et elles sont vulnérables aux situations anxigènes qui aboutissent souvent à du cannibalisme.

Les croisements entre souris de laboratoire et souris sauvages sont souvent délicats et peu productifs. Dans certains croisements, un ou plusieurs gènes de stérilité ségrègent, rendant impossible la production d'une F2. C'est systématiquement le cas avec *Mus spretus* en raison de l'effet Haldane, mais également parfois avec *Mus m. musculus* (Vyskocilova *et al.*, 2009).

Les croisements entre souris sauvages et souris de laboratoire sont parfois critiqués en raison de la trop grande densité de polymorphismes qui peut rendre difficile l'identification de la différence de séquence causale lors de l'identification d'un gène (DiPetrillo *et al.*, 2005). Toutefois les méthodes d'association haplotypique (*HAM*, *haplotype association mapping*) qui permettent de comparer les séquences de plusieurs lignées sont un moyen efficace de surmonter cette difficulté.

## 1.4. La peste

### 1.4.1. Infection par *Yersinia pestis*

La peste est une maladie bactérienne causée par le bacille Gram-négatif *Yersinia pestis* découvert par l'élève de Louis Pasteur, Alexandre Yersin, lors de l'épidémie de Hong-Kong, en 1894. C'est le pasteurien Paul-Louis Simond qui a montré en 1898 que la bactérie a pour réservoir le rat et qu'elle se transmet par l'intermédiaire des puces (Simond, 1898). Par la suite, le bacille a été retrouvé chez plus de 200 espèces de rongeurs sauvages et péri-domestiques chez lesquels elle peut causer des épizooties. *Xenopsylla cheopis* est l'espèce de puce vectrice habituelle chez le rat des pays chauds mais de nombreuses autres espèces de puces peuvent transmettre la peste. Ces ectoparasites s'infectent en prélevant du sang sur un animal malade en phase septicémique. La bactérie peut alors croître dans le proventricule de la puce et finit par l'obstruer et le bloquer. Lorsque la puce change d'hôte, le sang ingéré ne peut pénétrer dans le proventricule et est par conséquent régurgité, ce qui infecte le nouvel hôte. Le bacille circule ainsi en permanence dans les populations de rongeurs.

La peste humaine résulte le plus souvent de la piqûre accidentelle de l'homme par une puce du rat ayant été au préalable contaminée par un rongeur infecté. Une fois le bacille entré dans l'organisme par voie intradermique, il se dissémine vers le ganglion drainant. Sa multiplication intense et la réaction inflammatoire qu'il produit aboutissent à la formation d'un bubon, qui est un gonflement très douloureux du ganglion pouvant aller jusqu'à son ulcération ou sa rupture. L'apparition d'un bubon est un élément de diagnostic de la forme bubonique de la peste qui peut se transmettre d'homme à homme par les puces humaines. D'autres signes cliniques sont observés chez ces patients : une très forte fièvre accompagnée d'une grande fatigue allant jusqu'à l'épuisement et d'une soif intense, des céphalées, des troubles digestifs (vomissements et parfois diarrhées) voire des troubles du comportement (agitation, délire ou prostration). A partir de ce bubon, la bactérie peut se disséminer par la voie lymphatique et sanguine (septicémie) vers différents organes comme la rate, le foie et éventuellement les poumons où elle induit une peste pulmonaire secondaire. Cette forme bubonique est mortelle dans 40 à 70% des cas en moins d'une semaine en l'absence de traitement antibiotique précoce.

Lorsque l'infection s'est propagée aux poumons, des particules chargées en bacilles sont capables d'assurer une contamination interhumaine extrêmement efficace. L'inhalation de ces particules est responsable d'une infection primaire du poumon et de la forme pulmonaire de la

peste, qui est la plus mortelle. Au cours des 24 premières heures, la phase initiale de l'infection est marquée par une dégradation rapide et générale de l'état du patient, avec une fièvre élevée, une cyanose des extrémités, une tachycardie avec parfois arythmie, une prostration, et des céphalées souvent intenses, mais en l'absence de signes pulmonaires. Les premiers symptômes pulmonaires apparaissent au bout de la 48<sup>ème</sup> heure et se traduisent par l'apparition d'une toux intense et douloureuse, d'une détresse respiratoire, d'expectorations mucoïdes ou muco-purulents et parfois des signes neurologiques. La mort du patient survient entre 2 et 4 jours suivant la contamination, en l'absence d'une antibiothérapie adaptée et précoce.

D'autres formes cliniques, plus rares, peuvent être observées. Le bacille en pénétrant par d'éventuelles blessures cutanées ou par les conjonctives peut atteindre directement la circulation sanguine déclenchant une peste septicémique foudroyante. La maladie se déclare brutalement et le patient succombe seulement quelques heures après l'apparition des premiers signes cliniques.

Lors d'une peste bubonique, il arrive que la bactérie reste concentrée au niveau du bubon et ne se dissémine pas dans l'organisme. Cette forme est appelée peste mineure. L'évolution de la maladie tend vers la fistulisation du bubon et la guérison spontanée du patient.

#### 1.4.2. *Yersinia pestis* : la bactérie

*Yersinia* est constituée de 11 espèces dont seules *Y. pestis*, et certaines souches de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont pathogènes pour l'homme. *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont des bactéries enteropathogènes nettement moins virulentes et rarement mortels que *Y. pestis*. *Y. pestis* a un cycle de vie très différent de *Y. pseudotuberculosis*. Elle a pour réservoir différents rongeurs, dont principalement le rat. Le vecteur principal est la puce. Pourtant, *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont génétiquement très proches, avec plus de 90% d'homologie de séquence (hybridation ADN/ADN) (Bercovier *et al.*, 1979). Achtman et coll. ont montré que *Y. pestis* était issue d'un clone ayant émergé très récemment de *Y. pseudotuberculosis* (entre 1500 et 20 000 ans) (Achtman *et al.*, 1999). La comparaison des séquences des deux espèces, responsables de pathologies si différentes en termes de tropisme et de gravité, est actuellement utilisée afin d'identifier des régions du génome bactérien essentielles pour la pathogénicité du bacille de la peste.

Le séquençage du génome de différentes souches de *Y. pestis* et d'une souche de *Y. pseudotuberculosis* a montré un haut degré de conservation entre les deux espèces, qui atteint 97% d'homologie dans les séquences codantes (Chain *et al.*, 2004). De façon surprenante, la virulence de *Y. pestis* est corrélée à une perte de fonctions ancestrales lors de la divergence avec

*Y. pseudotuberculosis*, à la fois par la perte de matériel génétique mais aussi par l'inactivation de séquences codantes. A l'inverse, peu de matériel génétique a été acquis par *Y. pestis*, principalement sous forme de plasmides.

Le génome de *Y. pestis* est constitué d'un chromosome et de 3 plasmides (Perry & Fetherston, 1997) nommés pPla (ou pPCP1), pFra (ou pMT1) et pYV (ou pCD1). Alors que pYV est aussi porté par les souches pathogènes de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*, pPla et pFra sont spécifiques à *Y. pestis*. La virulence de *Y. pestis* provient donc d'une combinaison de facteurs de virulence partagés avec d'autres souches de *Yersinia*, et de facteurs de virulence qui lui sont spécifiques ayant contribué à son adaptation à un cycle de vie différent.

Le plasmide pPla (9,5 kb) code pour une protéase Pla qui possède une activité coagulase à 28°C et fibrinolytique (activateur du plasminogène) à 37°C. Ce plasmide joue principalement un rôle dans la dissémination de *Y. pestis* après qu'elle ait pénétré dans l'organisme de l'hôte via l'injection intradermique (Hinnebusch *et al.*, 2002). Il a ainsi été observé que les souches de *Y. pestis* exemptes de pPla étaient incapables de coloniser le ganglion (Sebbane F; 2006. PNAS 103:5526), et que pPla était aussi nécessaire au développement de la peste pulmonaire (Lathem *et al.*, 2007). L'acquisition de pPla n'est toutefois pas suffisante pour expliquer la virulence de *Y. pestis* car Pouillot *et coll.* ont montré que l'introduction de pPla dans la souche ancestrale *Y. pseudotuberculosis* ne permettait pas d'induire le degré de virulence observé avec *Y. pestis* (Pouillot *et al.*, 2005).

Le plasmide pFra est un grand plasmide de 100 kb qui porte notamment les locus impliqués dans la production de la pseudocapsule peptidique constituée de polymère de l'antigène F1 et de la toxine murine Ymt. La capsule est synthétisée *in vivo* à 37°C et permettrait de protéger la bactérie contre la phagocytose par les cellules de l'hôte (Du *et al.*, 2002) et contre certains agents antibactériens (Galvan *et al.*, 2008). Néanmoins, des souches dépourvues de capsule sont tout aussi virulentes pour l'animal de laboratoire que les souches capsulées (Davis *et al.*, 1996; Drozdov *et al.*, 1995). La toxine murine purifiée *in vitro* possède une activité sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de la souris mais sa participation dans le processus infectieux chez l'homme reste hypothétique. Son rôle dans le blocage du proventricule de la puce (et donc dans la transmission du bacille de la peste) a été démontré (Hinnebusch *et al.*, 1998; Sebbane *et al.*, 2009). La toxine murine Ymt a quant à elle pour rôle de favoriser la survie de *Y. pestis* dans l'intestin de la puce (Hinnebusch *et al.*, 2002) mais n'est pas nécessaire à la virulence.

Le plasmide de virulence pYV est le déterminant de virulence le plus étudié et le mieux caractérisé chez les *Yersinia*. Ce plasmide confère aux *Yersinia* qui le possèdent une cytotoxicité essentielle à l'expression de leur virulence. Cette dernière activité est maintenant bien comprise, et dépend d'un système de sécrétion de type III (TTSS), composé de l'appareil de sécrétion Ysc (pour Yop secretion) et des toxines Yops (pour Yersinia Outer Proteins) transloquées par ce système (Cornelis, 2002; Ramamurthi & Schneewind, 2002). Lorsque la bactérie entre en contact avec une cellule effectrice, elle injecte ainsi les Yops dans le cytosol de la cellule. L'injection des Yops inhibe la phagocytose et l'induction de la réponse inflammatoire (Ramamurthi & Schneewind, 2002) à de multiples niveaux. Ce mécanisme paralyse la réponse immunitaire innée de l'hôte qui est la première ligne de défense. Il permet aussi d'éviter la mise en place d'une réponse adaptative et favorise donc la prolifération de la bactérie dans l'hôte (Marketon *et al.*, 2005).

La machinerie de sécrétion, nommée injectisome, est composée d'une vingtaine de protéines Ysc qui permettent la formation d'une aiguille ancrée dans la membrane bactérienne. Les Yops transitent à travers cette aiguille avec l'aide de protéines chaperons. La translocation des Yops dans le cytoplasme de la cellule cible nécessite la présence de YopB, YopD et LcrV qui forment un canal dans la membrane cytoplasmique eucaryote à la suite d'un signal déclenché par YopN, lors du contact avec la cellule eucaryote.

Les protéines effectrices Yops, transloquées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes cibles, y exercent leur action : YopE (23 kDa) provoque la rupture des microfilaments d'actine dans les cellules HeLa ; YopH (51 kDa), une tyrosine phosphatase, agit en déphosphorylant des protéines impliquées dans la transmission du signal eucaryote ; YpkA/YopO (81 kDa) est une sérine/thréonine kinase qui agirait également au niveau de la transmission du signal ; YopM (41 kDa), une protéine acide qui forme un complexe avec les sérine/thréonine kinases PRK2 et RSK1 (McDonald *et al.*, 2003) et semble interférer dans la réponse immunitaire en déplétant les cellules NK (Kerschen *et al.*, 2004) ; YopJ/YopP (32,5 kDa) est impliquée dans l'apoptose des cellules cibles.

Le plasmide pYV de *Y. pestis* ne diffère de celui de *Y. pseudotuberculosis* que par des mutations ponctuelles touchant 2 gènes : l'adhésine YadA qui est inactivée, et la toxine YopP/J qui serait moins active en cytotoxicité, permettant à *Y. pestis* d'induire une réponse de l'hôte moins efficace (Zauberman *et al.*, 2009). Aussi appelé pCD1 (pour Calcium dependency), le plasmide pYV confère aussi aux *Yersinia* qui le possèdent la capacité de restreindre leur

croissance à 37°C en milieu pauvre en Calcium. Un système de régulation composé d'un activateur (VirF), dont l'activité est maximale à 37°C, augmente alors la transcription des gènes *yop* et la machinerie d'exportation. Un répresseur (LcrQ/YscM), qui s'accumulerait dans le cytoplasme lorsque le système de sécrétion est fermé, induirait un rétrocontrôle négatif des gènes *yop* (Cornelis & Wolfwatz, 1997).

Outre le plasmide de virulence pYV, *Y. pestis* partage avec les *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* les plus pathogènes, un facteur de virulence essentiel appelé "îlot de haute pathogénicité" (HPI). Il confère aux souches qui l'hébergent la capacité de tuer les souris à faibles doses et de causer des infections systémiques chez l'homme. Cet îlot porte un ensemble de gènes impliqués dans la capture du fer par l'intermédiaire d'un sidérophore spécifique, la yersiniabactine (Perry *et al.*, 1990). La bactérie peut ainsi trouver le fer dont elle a besoin pour sa croissance, malgré le très faible taux de fer libre, dans les tissus de l'hôte. Cet îlot est présent et très conservé chez différents membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, suggérant son acquisition récente par transfert latéral. En effet, cet îlot, inséré dans un locus *asnARNt*, est mobile et possède la capacité de s'exciser de ce locus et ainsi se perdre, ou se réintégrer dans un autre locus *asnARNt* du génome ou de se transmettre à une autre bactérie (Lesic & Carniel, 2005). L'HPI est situé dans un locus appelé *pgm* car il contient également des gènes conférant à la bactérie le caractère de pigmentation par capture d'hémine (HMS pour hemin storage). Le phénotype *Pgm*- coïncide donc avec une forte atténuation de virulence par perte du locus *pgm* entier. Une souche KIM *pgm*- a été injectée par voie sous-cutanée et intra-péritonéale chez la souris et s'est avérée avirulente (DL50 > 10<sup>7</sup> ufc). En revanche, lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse, la DL50 est d'environ 15 ufc (Une & Brubaker, 1984).

### 1.4.3. Epidémiologie

#### 1.4.3.1. *Les grandes épidémies de peste au cours de l'histoire*

La première grande épidémie de peste rapportée dans l'histoire date du milieu du VI<sup>ème</sup> siècle et est appelée peste de Justinien. Cette pandémie a sévi au VI<sup>ème</sup> siècle après JC dans tout le bassin méditerranéen. L'épidémie débuta sur le continent africain, remonta jusque dans le nord Ouest de l'Europe (Irlande, Grande Bretagne) via l'Italie et la France. Elle aurait tué plusieurs dizaines de millions de personnes.

La Peste Noire fût la seconde grande pandémie connue. Venue d'Asie Centrale, elle toucha l'Europe au XIV<sup>ème</sup> siècle et détruisit plus du quart de la population de l'Europe

Occidentale entre 1348 et 1352, et jusqu'à la moitié dans des villes comme Paris, Venise ou Hambourg. La peste noire eut des conséquences durables sur la civilisation européenne, d'autant qu'après cette première vague, la maladie refit régulièrement son apparition dans les différents pays touchés. Cette épidémie persista pendant plus de trois siècles et eut un impact important sur le développement socio-économique, la culture, l'art, la religion et la politique (Stenseth *et al.*, 2008).

La troisième pandémie partit de Hong Kong en 1894. C'est par la voie maritime, notamment grâce à la navigation à vapeur, que des continents épargnés jusqu'à présents (Amérique du Nord et du Sud, Madagascar, Afrique du Sud, ...) furent atteints. Cette troisième pandémie, appelé la peste des temps modernes, toucha principalement l'Inde en faisant 12 millions de morts entre 1898 et 1928.

#### 1.4.3.2. Répartition des cas de peste aujourd'hui

La peste est souvent considérée comme une pathologie du passé mais elle est toujours présente dans certaines parties du monde. Presque 40 000 cas humains ont été déclarés par l'Organisation Mondiale de la Santé entre 1985 et 2001 par 24 pays (2003). L'Afrique est le continent le plus touché avec en particulier des foyers endémiques très actifs à Madagascar, en République Démocratique du Congo et en Tanzanie. Viennent ensuite l'Asie du Sud-Est (Vietnam, Chine), l'Asie Centrale (Mongolie, Kazakhstan, Inde), et le continent américain. Des foyers actifs de peste sylvatique sont dispersés sur le tiers ouest des Etats-Unis et sont responsables chaque année de cas humains.

La république Démocratique du Congo a subi trois épidémies meurtrières entre 2005 et 2006, notamment dans des régions minières dans lesquelles aucun cas de peste n'avait été rapporté jusqu'à présent (Bertherat *et al.*, 2005). Il en est de même pour la zone côtière de Mahajanga (Madagascar) après 60 ans d'absence de la maladie. L'Inde, après 30 ans sans cas, a subi une épidémie de peste pulmonaire en 1994 qui a complètement paralysé le pays pendant plusieurs semaines (Ramalingaswami, 1995). En 1994, la maladie présente au Mozambique s'est propagée au Zimbabwe et au Malawi. Plus récemment, en 2003, la peste est survenue dans la région d'Oran en Algérie (Bertherat *et al.*, 2007).

Au total, la peste touche principalement, mais pas seulement, des pays en développement, en raison de la proximité de l'homme avec des rongeurs sauvages et des conditions d'hygiène

précaires. L'absence de cas avérés pendant plusieurs décennies ne permet jamais de considérer que l'infection a été éradiquée d'une zone géographique

#### 1.4.4. Diagnostic

##### 1.4.4.1. *Diagnostic bactériologique*

Le diagnostic peut être effectué soit par des techniques bactériologiques classiques soit par des techniques rapides comme l'immunochromatographie en bandelettes ou par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Divers prélèvements peuvent être faits sur le patient : bubons, sang, expectorations ou post-mortem, différents organes comme le foie, la rate ou les poumons. Dans un premier temps un examen sur lame permet de distinguer *Y. pestis*, immobile quelle que soit la température, de *Y. pseudotuberculosis* qui ne l'est pas. Après une coloration de Gram, on observe un petit bacille Gram-négatif qui présente une coloration bipolaire si le prélèvement est frais. Une coloration de Wayson peut aussi être effectuée à partir de frottis (Bahmanyar *et al.*, 1976).

*Yersinia pestis* croît aussi bien dans des milieux solides gélosés (TSA, Drigalski, MacConkey) que dans des milieux liquides (eau peptonée, BHI, etc ...). Le milieu sélectif CIN (Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin) permet d'éliminer, en partie, de potentielles bactéries contaminantes collectées lors du prélèvement ou dans l'organisme du patient.

*Y. pestis* croît à une température comprise entre 25 et 37°C. Sa croissance est lente, presque deux fois plus que celle des autres entérobactéries, et les colonies ne sont visibles généralement qu'au bout de 48h de culture.

*Y. pestis* peut être subdivisée en trois différents biotypes qui se différencient par leur capacité à réduire les nitrates et à fermenter le glycérol. Le biotype Antiqua (Glycérol +, Nitrate +) est essentiellement isolé en Afrique et en Asie centrale, Medievalis (Glycérol +, Nitrate -) est retrouvé dans le pourtour de la mer Caspienne, et Orientalis est implanté en Asie, Afrique et Amérique du Nord et du Sud (Glycérol -, Nitrate +).

##### 1.4.4.2. *Immunochromatographie en bandelettes*

Chanteau S. et coll. ont mis au point en 2003 une technique de diagnostic rapide de la peste par immunochromatographie en bandelettes (Chanteau *et al.*, 2003). Il est ainsi possible, à partir d'un prélèvement de bubon, d'expectoration, ou de sérum de savoir en moins de 15 minutes

si un patient est atteint ou non de la peste. Cette détection est basée sur la reconnaissance de l'antigène F1 produit par *Y. pestis* à 37°C. Cette technique permet de faire un diagnostic très rapide dans n'importe quelles conditions de terrain puisqu'elle ne nécessite pas de matériel particulier.

#### 1.4.4.3. PCR

Différentes techniques de diagnostic par amplification spécifique du génome de *Y. pestis* ont été mises au point afin de caractériser rapidement la présence ou non du pathogène à la fois chez les patients, la puce et les rongeurs (Higgins *et al.*, 1998; Hinnebusch & Schwan, 1993; Rahalison *et al.*, 2000). Ce diagnostic par PCR permet de détecter la présence de la bactérie même si cette dernière n'est plus vivante (aussi le cas pour la détection par bandelettes) pour différentes causes : mauvais stockage des échantillons lors du transport, traitement du patient, etc. Une technique de PCR en temps réel permet d'obtenir un diagnostic encore plus rapide (Loiez *et al.*, 2003; Tomaso *et al.*, 2003). L'inconvénient de cette technique est qu'elle demande un matériel spécialisé et ne peut être faite qu'au laboratoire.

#### 1.4.5. Traitement de la peste

##### 1.4.5.1. *Traitements et prophylaxies médicamenteux*

Le traitement de la peste est basé sur l'administration d'antibiotiques. L'OMS recommande la streptomycine, les cyclines et le chloramphénicol en monothérapie. Plus récemment, d'autres alternatives ont été proposées comme l'utilisation des fluoroquinolones et de la gentamycine. Des personnes ayant été en contact avec un cas de peste reçoivent une antibiothérapie prophylactique.

##### 1.4.5.2. *Vaccination*

Les premières vaccinations furent effectuées par Girard et Robic à Madagascar en 1934 à partir d'une souche vivante de virulence atténuée. Des bactéries tuées ont aussi été utilisées pour la vaccination. Mais aujourd'hui ces vaccins sont presque abandonnés car ils ne protègent pas ou peu de la forme pulmonaire. De plus, ces vaccins sont généralement mal tolérés par les patients et ne confèrent qu'une protection de courte durée. L'antibiothérapie ayant une très bonne efficacité, elle est devenue le principal mode de traitement à la fois curatif et préventif.

#### 1.4.5.3. *Apparition de résistances aux antibiotiques*

Bien que *Y. pestis* soit habituellement sensible aux antibiotiques l'acquisition de résistance à ces molécules a pu être observée en 1995 à Madagascar, où deux souches résistantes ont été isolées sur des patients atteints de peste bubonique. La première souche possédait une résistance importante à la streptomycine qui est l'antibiotique de référence dans de nombreux pays. La seconde résistait à huit antibiotiques dont les quatre recommandés par l'OMS pour les traitements curatif et prophylactique (Galimand *et al.*, 2006). Hinnebusch et coll. ont mis en évidence que la transmission du plasmide s'était faite dans le tube digestif de la puce (Hinnebusch *et al.*, 2002). Welch et coll. ont montré que le plasmide de multirésistance était aussi présent chez des entérobactéries largement répandues dans les produits alimentaires (Welch *et al.*, 2007). Ceci laisse redouter l'émergence de nouvelles souches multirésistantes aux antibiotiques, ce qui pourrait constituer un réel problème de santé publique.

#### 1.4.6. Bioterrorisme

*Y. pestis* est l'un des principaux agents bactériens pouvant être utilisés comme arme biologique. L'utilisation d'un aérosol de cette bactérie pourrait être responsable d'une grande épidémie de forme pulmonaire primaire dans la population exposée. La bactérie pourrait également être utilisée pour infecter les rongeurs, responsables de la dissémination à l'homme (Inglesby *et al.*, 2001; Levison, 2000).

*Y. pestis* est une bactérie relativement fragile. Cependant, une à dix bactéries suffisent pour infecter un rongeur par voie orale, intradermique, sous-cutanée ou intraveineuse (Brubaker, 1991). La dose minimale infectieuse capable de provoquer une pneumopathie primitive a été estimée entre 100 et 20 000 bactéries chez des primates (Franz *et al.*, 1997).

Ce risque est d'autant plus important et critique depuis l'apparition de souches multirésistantes à certains antibiotiques les plus classiquement utilisés en cas d'infection (Hinnebusch *et al.*, 2002).

#### 1.4.7. Modèles animaux de la peste

##### 1.4.7.1. *Modélisation de l'infection par Yersinia pestis*

Depuis plusieurs dizaines d'années, des modèles d'infection expérimentale sur des animaux de laboratoire ont été décrits dans le but de mimer plus ou moins fidèlement les deux formes, bubonique et pulmonaire, de la peste. Ces travaux ont porté principalement sur les

rongeurs, rats et souris, mais aussi sur des primates non humains (Welkos *et al.*, 2002). Nombre d'entre eux, en particulier parmi les plus anciens, avaient pour objectif d'évaluer la protection apportée par des préparations vaccinales. Plus récemment, des études sur la physiopathologie de l'infection et sur l'expression des gènes bactériens chez l'hôte ont été publiées.

Chez le rat, la forme bubonique a été modélisée, par exemple, par inoculation de la bactérie par voie intradermique dans l'oreille (Sebbane *et al.*, 2005). Après injection de 600 ufc de *Y. pestis*, souche virulente 195/P, les ganglions lymphatiques drainants proximaux sont rapidement colonisés (6h). La bactérie n'est retrouvée dans les ganglions distaux, le sang et la rate qu'au bout de 36h. La charge bactérienne augmente de façon exponentielle dans l'ensemble des organes colonisés jusqu'à 72h. Les taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 mesurés dans le sérum entre 48 et 72h après inoculation sont très faibles alors que le taux d'IFN- $\gamma$  est assez élevé et corrélé avec la charge bactérienne sérique. Ce modèle animal reproduit bien les symptômes observés chez les patients atteints de peste bubonique et peut donc être utilisé pour comprendre la réponse mise en place par l'hôte, notamment durant la phase précoce de colonisation des ganglions lymphatiques.

La forme pulmonaire a été modélisée chez les rongeurs en réalisant l'infection soit par aérosol, soit par instillation intra-nasale. Ainsi, Agar et coll. ont décrit l'infection de rats Brown Norway par un aérosol de la souche virulente CO92 à une dose de 8,6 fois la DL50 (Agar *et al.*, 2009). Dans ces conditions, la bactérie colonise rapidement le poumon et se propage par voie sanguine vers d'autres organes comme le foie et la rate. Les premiers signes histologiques d'inflammation apparaissent dans les poumons dans les 24 premières heures suivant l'infection, avec un afflux de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes.

Des essais de transmission de la bactérie de rats infectés par aérosol à d'autres rats non infectés ont été effectués et se sont révélés concluants contrairement aux modèles murins (Agar *et al.*, 2009). En effet, les souris n'ont pas la capacité de tousser contrairement aux rats. Ce modèle permet donc d'étudier ce mode de transmission qui est très certainement, en plus des puces contaminées, l'un des modes potentiels de transmission de la bactérie au sein des réservoirs naturels. Il peut aussi être utilisé pour mieux comprendre les contaminations interhumaines.

Au même titre que le rat, des études physiopathologiques chez la souris ont été effectuées. Bubeck SS et coll. (2007) ont étudié la réponse immune précoce face à une infection pulmonaire avec une souche virulente de *Y. pestis* (CO92) chez des souris consanguines (C57BL/6J) et non consanguines (CD1). Ces souris sont sensibles à l'infection et succombent à

l'infection dès 3 jours après l'inoculation. La charge bactérienne a été mesurée entre 24h et 48h après inoculation de la bactérie dans les poumons, la rate et le foie et montre une augmentation croissante au fur et à mesure de l'infection et de façon similaire entre les deux lignées de souris testées.

De plus, l'apparition de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires de souris infectées n'est détectée que 48h après l'inoculation ce qui corrèle avec le recrutement de leucocytes polymorphonucléaires (PMN) dans les poumons (Bubeck *et al.*, 2007).

#### 1.4.7.2. Etude des mécanismes immunologiques de réponse à l'infection par *Y. pestis*

Certains acteurs de la réponse immune, comme les cytokines, peuvent être mesurés au cours de l'infection dans le but de mieux comprendre la hiérarchisation des processus physiologiques mis en place en réponse à l'infection par *Y. pestis*.

Par exemple, en parallèle des études histologiques et de la charge bactérienne dans les organes, des dosages de cytokines et de chimiokines ont été faits dans les différents compartiments (poumons, rate, foie et sang) chez les rats utilisés pour étudier la forme pulmonaire de la peste (Agar *et al.*, 2009). Dans les poumons, des cytokines comme MIP1 $\alpha$  (*Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha*), MCP-1 (*Monocyte-Chemoattractant Protein-1*) et GRO/KC (*Growth-related oncogene/keratinocyte-derived chemokine*, l'équivalent de KC chez la souris) sont significativement élevés 48h après inoculation et augmente jusqu'à 72h. Ces chimiokines ont pour rôle de recruter les cellules inflammatoires au niveau des tissus atteints et d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'infection. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-17 sont significativement élevées 72h après inoculation.

Le taux d'IL-18 augmente de façon progressive et significative dès 24h après inoculation de la bactérie. Cette cytokine joue un rôle important dans l'induction des lymphocytes T à produire de l'IFN- $\gamma$  et de façon plus tardive pour faciliter l'activation des macrophages en réponse à l'infection. Au-delà de 72h, la réponse immune est incapable de contrôler la prolifération de la bactérie chez le rat et l'animal succombe entre 72 et 96h après inoculation.

#### 1.4.7.3. *Etude de l'expression des gènes chez la bactérie et chez l'hôte*

Des études d'expression ont été faites pour caractériser l'expression des gènes de la bactérie dans l'hôte mais aussi chez l'hôte pour identifier des gènes impliqués dans le contrôle de l'infection.

Lathem WW et coll. (2005) ont étudié l'expression de gènes de *Y. pestis* 48 heures après inoculation de la bactérie par voie aérosol chez la souris dans le but d'identifier des gènes sur- ou sous-exprimés au cours de l'infection. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence que pCD1 est plus fortement exprimé par la bactérie lors de l'infection *in vivo* qu'après activation par culture de la bactérie à 37°C *in vitro*. Ils en ont conclu que l'environnement de l'hôte apporte des facteurs d'activation supplémentaires (Lathem *et al.*, 2005).

Les travaux de Rogers JV et coll. (2007) ont mis en évidence des différences d'expression de gènes impliqués dans le processus biologique mis en place dans la rate chez la souris 48h après inoculation par voie intrapéritonéale de 257 ufc de *Y. pestis* CO92. De nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, dans la réponse immunitaire, dans le cycle cellulaire, dans la dégradation des protéines ont ainsi pu être caractérisés (Rogers *et al.*, 2007).

#### 1.4.7.4. *Identification de facteurs génétiques contrôlant la vulnérabilité de l'hôte à l'infection*

Le modèle murin a aussi été utilisé pour identifier des facteurs génétiques de l'hôte contrôlant la vulnérabilité face à l'infection. Turner et coll. (2009) ont montré que les souris BALB/cJ étaient résistantes à l'injection par voie intraveineuse d'une souche de *Y. pestis* KIM5 *pgm*- mutante contrairement aux souris C57BL/6J (Turner *et al.*, 2009). Le locus *pgm* de *Y. pestis* code pour des facteurs de virulence de la bactérie. Sans cette région, la souche a une virulence très atténuée. Après avoir produit une population de (C57BL/6J x BALB/c)F2 et BC, un QTL, appelé *Prll*, a été identifié sur le chromosome 17 contrôlant le nombre de bactéries par gramme d'organe dans la rate 48h post-inoculation. Les auteurs ont par la suite produit des souris congéniques pour ce locus (*prll* d'origine BALB/cJ dans un fonds génétique C57BL/6J). Ces souris ont montré un nombre de bactéries dans la rate 48h post-inoculation identique à la lignée parentale BALB/cJ ce qui confirme l'existence du QTL identifié. Cette région chromosomique correspond au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Elle contient de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire et il est de ce fait difficile d'identifier le gène responsable du phénotype observé. A cause de son rôle central en immunologie, cette région a été souvent

associée à des différences de sensibilité divers pathogènes tels que *Plasmodium berghei*, *Clamydia pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*.

Congleton et coll. ont montré que certaines sous-lignées de souris 129 sont résistantes à une injection intraveineuse d'une souche de *Y. pestis pgm*- mais sont sensibles à une infection par une souche virulente CO99-3015 (Congleton *et al.*, 2006). Turner et coll. ont mis en évidence que le phénotype de résistance observé chez les souris knock-out pour l'*IL-10* (*IL-10*<sup>-/-</sup>) était en partie conféré par un allèle d'origine 129/P2J (région de 30 cM autour du gène *IL-10*) hérité du fonds génétique des cellules ES utilisées pour la délétion de ce gène (Turner *et al.*, 2009).

A l'heure actuelle, aucune lignée de souris n'a été décrite comme résistante à une souche virulente de *Y. pestis*.

### 1.5. Objectifs du travail de thèse

La très grande pathogénicité du bacille pesteux est encore actuellement très mal comprise. De nombreux travaux ont porté sur les facteurs de virulence de la bactérie et sur la façon dont ils sont capables de paralyser les défenses (en particulier innées) de l'hôte mammifère pour permettre la survie, la réplication et la dissémination de la bactérie. En revanche, il existait, au moment où nous avons commencé ce travail, très peu de données sur les facteurs génétiques de l'hôte capables d'influencer sa réponse à une infection par *Y. pestis*.

Des expériences préliminaires avaient mis en évidence une différence importante de sensibilité entre la lignée de laboratoire C57BL/6 et la lignée sauvage SEG/Pas (*Mus spretus*). Cette différence, qui s'est avérée considérable, offrait un moyen puissant d'identifier les mécanismes et les gènes qui permettent à une souris de résister à une infection habituellement mortelle, d'autant plus qu'elle était observée en utilisant une souche pleinement virulente administrée par une voie (sous-cutanée) qui se rapproche de l'infection par la puce.

C'est ainsi qu'a été lancé un projet collaboratif visant, d'une part à identifier des différences physiopathologiques entre les deux lignées à la suite d'une infection expérimentale, d'autre part à identifier les gènes responsables de l'exceptionnelle résistance des souris SEG/Pas.

Mon travail de thèse a porté sur la première de cette seconde approche, l'identification de régions du génome portant des gènes de résistance à la peste et l'étude de leurs interactions par une approche de cartographie de QTL. J'ai associé deux approches complémentaires.

Partant des deux lignées parentales, j'ai produit un grand croisement en retour interspécifique de plus de 500 souris pour rechercher des gènes de résistance sur l'ensemble des chromosomes. En raison du phénotype analysé (la mort ou survie des animaux suivant leur infection), je pouvais espérer identifier des gènes à effet assez fort.

J'ai également analysé un jeu de lignées recombinantes congéniques produites dans l'unité entre les lignées C57BL/6 (receveuse) et SEG/Pas (donneuse). Ce jeu pré-existant permettait de cribler environ 40% seulement du génome mais offrait une plus grande puissance pour détecter des gènes à effet faible. Il permettait également de localiser d'emblée les gènes impliqués dans des régions assez petites (une douzaine de mégabases en moyenne).

Par ailleurs, j'ai également été associée à une partie des expériences de physiopathologie entreprises dans le cadre du projet collaboratif.

Les données présentées dans la deuxième partie de ma thèse sont issues de ces différentes approches.

# MATERIELS ET METHODES

## **2. Matériels et méthodes**

La plupart des protocoles utilisés au cours de mon travail sont décrits dans l'article présenté dans la partie 3. Ne sont présentés ici que les protocoles des expériences complémentaires.

### *2.1. Génotypage*

Les animaux ont été génotypés à partir d'une biopsie caudale réalisée au sevrage. Deux protocoles d'extraction d'ADN ont été utilisés. Les ADN envoyés au Centre National de Génotypage à Evry ont été préparés par extraction au phénol/chloroforme pour obtenir la pureté requise. Les biopsies caudales ont été digérées, dans 500  $\mu$ L d'un tampon comprenant 50 mM de Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA et 0,5% SDS, additionné de 60  $\mu$ g de protéinase K, sous agitation à 800 tours/minute pendant 4h environ à 56°C. Après une extraction au phénol puis une extraction au chloroforme, la phase aqueuse a été mélangée à 1 mL d'éthanol pur réfrigéré. Après centrifugation, l'ADN a été séché et repris dans 500  $\mu$ L d'eau. La concentration en ADN et la pureté ont été mesurées par spectrophotométrie à des longueurs d'onde de 280 et 260 nm.

Le génotypage des souris congéniques a utilisé un protocole d'extraction d'ADN simplifié. Environ 1 mm de queue a été prélevé et digéré dans 500  $\mu$ L de tampon constitué de 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH = 8,3), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml de gélatine, 0,45% Nonidet P40 et 0,45% de Tween 20, additionné de 60  $\mu$ g de protéinase K mis sous agitation à 800 tours/minute à 56°C pendant environ 4h. Les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 10 000 rpm. L'ADN obtenu est de qualité suffisante pour l'amplification par PCR de marqueurs microsatellites qui a été réalisée avec 20 ng. Le mélange réactionnel (20  $\mu$ L) contenait 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 nmol de chaque dNTP, 0,5 unité de Taq polymérase (Qbiogen), 0,5  $\mu$ l de chaque primer Forward (concentration = 10  $\mu$ M, Eurogentec ou MWG). Le programme d'amplification comportait une phase initiale à 94°C pendant 3 minutes puis 34 cycles à 94°C pendant 40 secondes, 55°C pendant 40 secondes, 72°C pendant 40secondes, puis une élongation terminale à 72°C pendant 5 minutes.

Les produits de PCR ont été analysés par migration en gel d'agarose à 4% (Nusieve) et visualisation aux UV par coloration au bromure d'éthidium (Invitrogen).

## 2.2. Animaux

Les souris ont été infectées à l'âge de 8 à 12 semaines. Les souris SEG/Pas et congéniques ont été élevées dans l'animalerie centrale de l'Institut Pasteur. Les souris C57BL/6J ont été achetées à l'âge de 6 semaines chez Charles River et ont été acclimatées pendant 3 à 4 semaines dans l'animalerie centrale de l'Institut Pasteur.

## 2.3. Température

La température centrale des souris au cours de l'infection a été mesurée à l'aide de sondes de télémétrie (PLEXX) implantées par voie sous-cutanée en région interscapulaire deux semaines avant l'infection. La sonde envoie au lecteur le code d'identification de l'animal et la température mesurée à l'instant de la mesure. Les animaux infectés étant hébergés en isolateur, la lecture des sondes se fait en présentant la souris contre la paroi de l'isolateur, à environ 20 mm du lecteur.

## 2.4. Bactériémie

La bactériémie des animaux infectés a été mesurée à 24, 48 et 72 heures après infection sur un prélèvement de sang (200 µL) réalisé au sinus rétroorbitaire. Les échantillons ont été étalés sur des boîtes LB hémine, purs, après dilution au 1/10 et au 1/100 en sérum physiologique, sous un volume de 100 µL. Les colonies ont été comptées après une incubation de 48h à 28°C.

## 2.5. Prélèvement de macrophages et culture cellulaire

Les souris ont été euthanasiées par pentobarbitol. Les cellules péritonéales ont été collectées en injectant 5 mL de RPMI par voie intrapéritonéale et en aspirant le liquide. Les cellules ont été comptées et mises en plaques à la concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL (1 mL/puits). Après 1h d'incubation à 37°C + 5% de CO<sub>2</sub>, les puits ont été lavés avec 2 ml de RPMI afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes ont été considérées comme étant des macrophages péritonéaux et cultivées en RPMI contenant 1% de sérum de veau foetal (SVF).

Les macrophages ont été stimulés pendant 5h avec 10 ng de TNF $\alpha$  recombinant de souris (R&D Systems, Minneapolis, MN). Les surnageants ont alors été récupérés et conservés à -20°C en attendant les dosages de cytokines. Les cellules ont été lysées en vue de l'extraction des ARNm.

## 2.6. Dosage de l'IL-6 par ELISA

La concentration en IL-6 dans les surnageants de culture a été mesurée par ELISA en utilisant le kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN) selon le protocole du fabricant.

## 2.7. Extraction des ARNm et RT-PCR

Les ARNm des macrophages péritonéaux non stimulés et stimulés par le TNF $\alpha$  ont été extraits à l'aide du kit RNeasy (QIAGEN). Leur concentration a été mesurée à l'aide d'un NanoDrop (Labtech) et leur qualité a été vérifiée en faisant migrer 2  $\mu$ L sur un gel d'agarose à 1%.

Les réactions de RT-PCR ont été réalisées sur 0,6  $\mu$ g d'ARNm. Les échantillons ont été traités par la DNase pour éliminer toute trace d'ADN génomique. L'ADNc a été obtenu par transcription inverse à l'aide du RT<sup>2</sup> First Strand Kit. Il a ensuite été mélangé avec le kit RT<sup>2</sup> Realtime SYBR/ROX PCR Mix (SABiosciences) et réparti dans les plaques 96 puits contenant au préalable les oligonucléotides lyophilisés permettant d'amplifier 84 gènes de la voie de signalisation du TNF et de ses récepteurs, 6 gènes de ménage, 3 témoins positifs et 3 témoins négatifs (plaques TNF and receptors PCR array mouse, RT<sup>2</sup> profiler PCR array - SABiosciences) (tableau 2, partie résultats). La réaction de PCR a été réalisée sur un thermocycleur MX3005 (Stratagène) et comportait une phase de 10 minutes à 95°C puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et une minute à 60°C. Les valeurs obtenues pour les gènes d'intérêt sont rapportées avec ceux des gènes dits « de ménage » (dont l'expression est constante). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Ingenuity (Ingenuity Systems) pour visualiser les niveaux d'activation ou de répression des gènes étudiés et leur position dans les voies de signalisation.

## 2.8. Analyse statistique

La majorité des analyses ont été faites avec le logiciel Statview version 5.0 (SAS Institute Inc.). Les courbes de survie ont été comparées par un test de Logrank (ou Mantel-Cox).

Lorsque les données suivaient une distribution normale, les moyennes des groupes ont été comparées par analyse de la variance (ANOVA). Dans le cas contraire, les groupes ont été comparés par un test de Mann-Whitney (deux groupes) ou par un test de Kruskal Wallis (plus de deux groupes). Les proportions d'individus résistants ou sensibles dans deux groupes ont été comparées par un test exact de Fisher.

Le logiciel R/QTL (Broman K, 2003) et sa version sous Java J/QTL ont été utilisés pour la recherche de QTLs. Pour la recherche d'un QTL (fonction "scanone"), les données de mortalité ont été analysés sous le modèle "two-part" qui calcule séparément le LOD score associé au taux de survie final (noté LOD.p) et le LOD score associé au jour de mort des individus sensibles (noté LOD.μ). Cette analyse permet de distinguer des locus agissant sur l'une ou l'autre caractéristique des courbes de survie. La somme des deux LOD score (notée LOD.p.μ) permet d'évaluer l'effet total d'un locus. Les seuils de significativité à 5% et 10% ont été calculés par 1000 permutations des données.

Des interactions épistatiques ou additives entre locus ont été recherchées à l'aide de la fonction "scantwo" qui analyse soit le taux de survie, soit le jour de mort. Le seuil de significativité a été calculé sur la base de 500 permutations.

# RESULTATS

### **3. Résultats**

#### *3.1. Introduction*

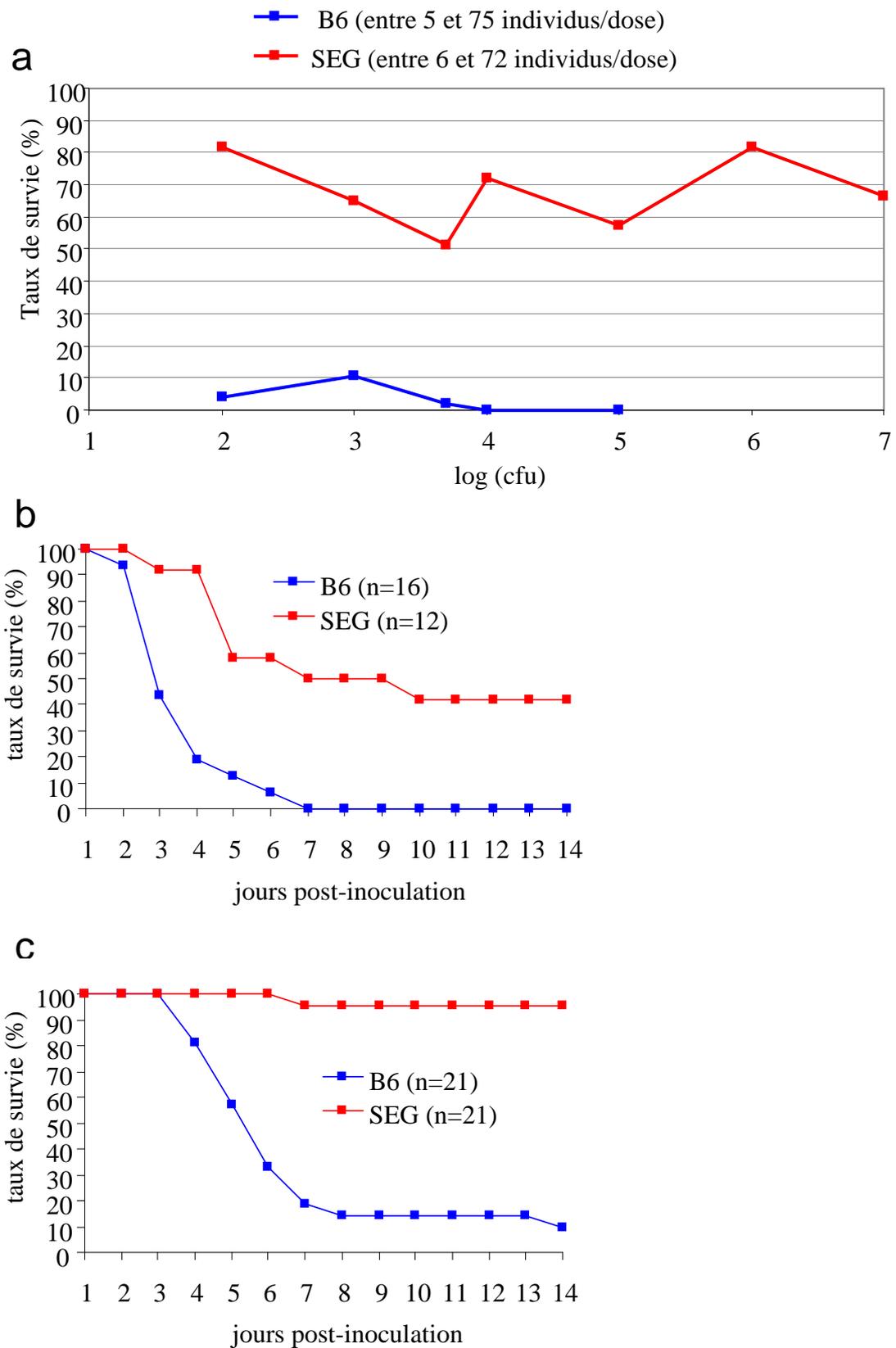
L'Unité des *Yersinia* de l'Institut Pasteur, dirigée par le Dr Elisabeth Carniel utilise depuis de nombreuses années un modèle d'infection expérimentale par *Y. pestis* par voie sous-cutanée, afin de se rapprocher des conditions de l'infection naturelle. L'Animalerie Centrale de l'Institut Pasteur possède une collection de lignées consanguines de souris sauvages appartenant aux sous-espèces *M. m. musculus*, *M. m. domesticus* et à l'espèce *Mus spretus* (en particulier la lignée SEG/Pas). Avant mon arrivée dans l'Unité de Génétique fonctionnelle de la Souris, Marek Szatanik avait comparé la vulnérabilité à une souche pathogène de *Y. pestis* (CO92) de plusieurs lignées sauvages avec celle de souris de laboratoire C57BL/6. Il avait montré que les souris de la lignée SEG/Pas résistaient presque toutes à une infection par  $10^3$  ufc de bactéries alors que la plupart des souris C57BL/6 mourraient après injection de seulement 10 ufc. Ces premiers résultats ont servi à initier un programme collaboratif avec quatre autres unités de l'Institut Pasteur (*Yersinia*, Cytokines & Inflammation, Immunophysiologie et Parasitisme Intracellulaire, et Histotechnologie et Pathologie). Les deux objectifs étaient d'identifier des différences physiopathologiques susceptibles d'expliquer la différence de vulnérabilité entre les deux lignées, et d'identifier les régions génomiques et ultimement les gènes impliqués dans le contrôle génétique de cette différence. Mon projet de thèse s'est principalement inscrit dans ce deuxième objectif. J'ai également participé aux expériences de physiopathologie.

#### *3.2. Influence de plusieurs facteurs sur la réponse des souris infectées par *Y. pestis**

Lors de mon arrivée au laboratoire, une série d'expériences préliminaires avait été réalisée par Marek Szatanik, dans lesquelles plusieurs conditions avaient varié. J'ai effectué une analyse rétrospective de ces données pour caractériser l'effet de plusieurs facteurs et identifier ceux qui pouvaient affecter la vulnérabilité des souris.

##### *3.2.1. Effet de la dose infectieuse*

La vulnérabilité des deux lignées SEG/Pas et C57BL/6J a été évaluée en calculant la DL50 (figure 10a). Dans un premier temps, des groupes comprenant entre 5 et 75 souris ont été infectés avec des doses de bactéries variant entre  $10^2$  et  $10^5$  ufc pour C57BL/6J et entre  $10^2$  et  $10^7$



**Figure 10** : a) Proportions de souris C57BL/6J et SEG/Pas résistantes en fonction des doses injectées ; b) Courbe de survie des lignées C57BL/6J (n=16) et SEG/Pas (n=12) à 10<sup>6</sup> ufc (p<0,0001) ; c) Courbe de survie des lignées C57BL/6J (n=21) et SEG/Pas (n=21) à 10<sup>2</sup> ufc (p<0,0001)

ufc pour SEG/Pas. La lignée C57BL/6J montre une très grande sensibilité, toujours supérieure à 90% quelle que soit la dose testée. La DL50 pour cette lignée a donc été estimée inférieure à 10 ufc. En revanche, la résistance des souris SEG/Pas n'est jamais descendue en dessous de 50%, même pour de très fortes doses, en dépit de fluctuations. Il n'a donc pas été possible de calculer de DL50 pour cette lignée.

Dans une seconde expérience, les deux lignées ont été testées à des doses de  $10^2$  et  $10^6$  ufc (figures 10b, et c). Les courbes de survie ont été comparées par un test de Mantel-Cox. Une différence de sensibilité très significative a été retrouvée aux deux doses testées, même si le taux de survie des SEG à  $10^6$  ufc était plus faible.

Au vu de ces expériences, nous avons conclu que les résultats obtenus aux fortes doses étaient peu reproductibles et nous avons retenu la dose de  $10^2$  ufc comme étant celle qui discrimine le mieux les deux lignées parentales et qui donne le moins de variabilité entre expériences.

### 3.2.2. Influence du sexe et de l'âge des souris

Pour étudier rétrospectivement l'effet de l'âge des souris à la date de l'injection sur leur sensibilité, les individus ont été regroupés de façon à créer des groupes d'âge de taille suffisante et homogène. Le sexe a également été pris en compte dans l'analyse.

L'effet de chaque facteur a été testé en comparant les courbes de survie des différents groupes par un test de Mantel-Cox. Aux doses de  $5.10^3$  et  $10^6$  ufc, la sensibilité des souris SEG/Pas ne dépend pas de leur sexe. A la dose de  $10^6$  ufc, les mâles SEG/Pas ne montrent pas de différence de sensibilité entre 9 et 13 semaines. A la dose de  $5.10^3$  ufc, la sensibilité des souris C57BL/6J ne varie pas significativement entre mâles et femelles. A la dose de  $10^6$  ufc, elle ne varie pas significativement en fonction de leur âge à la date d'injection (compris entre 9 et 37 semaines).

Les résultats obtenus de ces expériences préliminaires suggèrent que le sexe ne semble pas influencer la sensibilité des animaux. L'âge des animaux semble aussi sans être effet notable sur la sensibilité et nous avons décidé d'infecter par la suite les souris entre 8 et 12 semaines. Les animaux à cet âge sont adultes et ont un système immunitaire mature.

### 3.2.3. Variabilité entre expériences

Il s'est avéré difficile d'évaluer la variabilité des résultats entre les expériences successives du fait que les groupes testés dans ces expériences n'étaient pas toujours comparables en sexe, dose ou âge. Néanmoins, nous avons observé des fluctuations significatives, en particulier lorsque des petits effectifs d'animaux par groupe étaient utilisés (ce que nous avons pu observer également par la suite).

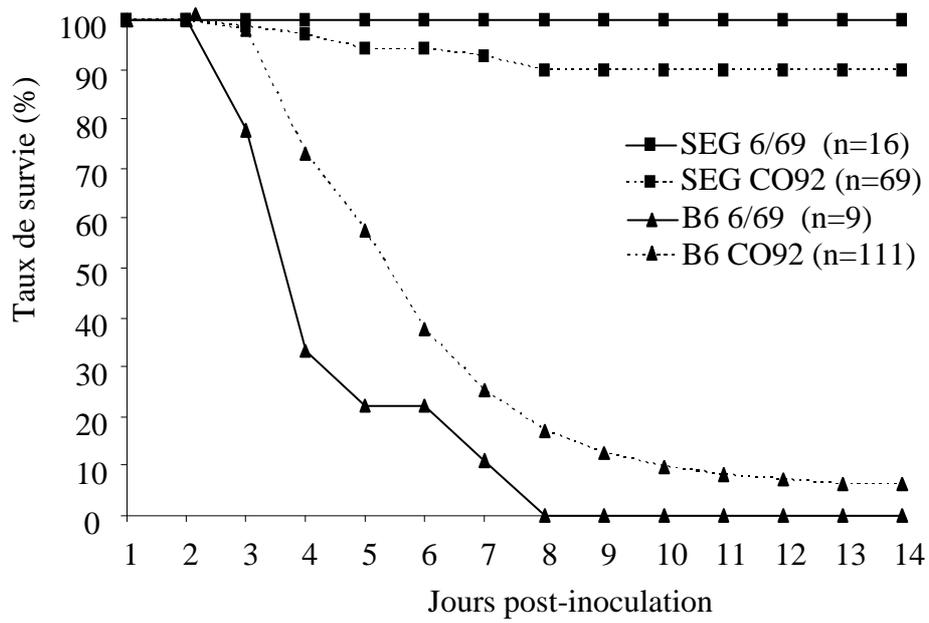
Une partie de cette variabilité peut s'expliquer par les différences de qualité (concentration bactérienne, homogénéité de la suspension) entre des préparations successives de la bactérie. Dans le but de réduire la variabilité entre expériences ainsi que le nombre d'expériences, il a été décidé d'organiser les expériences de façon à infecter des lots importants d'animaux (plusieurs dizaines), et d'inclure à chaque fois des animaux des deux lignées parentales pour contrôler le bon déroulement de l'expérience et sa reproductibilité.

### 3.2.4. Origine des animaux utilisés

Les souris SEG/Pas sont élevées à l'Institut Pasteur, dans une animalerie semie-protégée alors que les souris C57BL/6J provenant de fournisseurs extérieurs (Charles River ou Janvier) présentent un statut sanitaire très propre. Nous avons voulu savoir si la différence de statut sanitaire au moment de l'infection pouvait affecter leur sensibilité. Pour cela, nous avons infecté, à l'âge de 9 semaines, des souris C57BL/6 deux jours après leur livraison ou après une période d'acclimatation de 3 semaines dans une animalerie de l'Institut Pasteur. Les animaux acclimatés avant l'infection sont plus sensibles que les animaux infectés dès leur arrivée, quel que soit le fournisseur. Pour que l'effet de l'environnement soit aussi homogène que possible entre les groupes, nous avons décidé d'acclimater les souris dans une animalerie avant l'infection.

### 3.2.5. Souche bactérienne

Pour vérifier que la différence de résistance observée entre les lignées C57BL/6J et SEG/Pas n'était pas spécifique de la souche de *Y. pestis* CO92, nous avons utilisé dans les mêmes conditions la souche 6/69 présentant la même virulence, mais est d'une origine indépendante (la souche CO92 a été isolée chez un patient aux USA alors que la souche 6/69 provient d'un malade infecté à Madagascar). Les résultats, présentés dans la figure 11, montrent des résultats similaires entre les deux souches.



**Figure 11** : Courbe de survie de souris C57BL/6J et SEG/Pas infectées par 100 cfu de *Y. pestis* CO92 ou 6/69.

### 3.2.6. Paramètres expérimentaux retenus

Sur la base de ces analyses, nous avons retenu les conditions expérimentales suivantes pour la suite des expériences :

- acclimatation des souris dans l'animalerie avant infection : au moins 3 semaines;
- âge au moment de l'infection : entre 8 et 12 semaines;
- sexe (lorsque le choix est possible) : de préférence femelle (pour des raisons pratiques);
- souche bactérienne : CO92
- voie et dose :  $10^2$  ufc par voie sous-cutanée en région ventrale

### 3.3. Article

Article soumis à PNAS.

Titre: *Mus spretus* SEG/Pas mice resist virulent *Yersinia pestis* infection, under multigenic control.

Liste des auteurs: Charlène BLANCHET, Jean JAUBERT, Elisabeth CARNIEL, Geneviève MILON, Corinne FAYOLLE, Marek SZATANIK, Jean-Jacques PANTHIER and Xavier MONTAGUTELLI

## BIOLOGICAL SCIENCE: GENETICS

***Mus spretus* SEG/Pas mice resist virulent *Yersinia pestis*, under multigenic control.**

Charlène Blanchet<sup>\*</sup>, Jean Jaubert<sup>\*</sup>, Elisabeth Carniel<sup>†</sup>, Corinne Fayolle<sup>†</sup>, Geneviève Milon<sup>‡</sup>, Marek Szatanik<sup>§</sup>, Jean-Jacques Panthier<sup>\*</sup> and Xavier Montagutelli<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Institut Pasteur, Mouse Functional Genetics Unit, CNRS URA 2578, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS.

<sup>†</sup> Institut Pasteur, Yersinia Unit, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS.

<sup>‡</sup> Institut Pasteur, Immunophysiology and Intracellular Parasitism Unit, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS.

<sup>§</sup> Institut Pasteur, Invasive Bacterial Infections Unit, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS.

Corresponding author :

Xavier MONTAGUTELLI

25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS cedex 15, France

Tel: (33) 1 45 68 85 54 - Fax: (33) 1 45 68 86 34

email: xmonta@pasteur.fr

Manuscript information :

16 text pages, 6 figures + 2 supporting figures, 0 table

**Authors contribution:** CB, JJ, EC, GM, JJP and XM designed research; CB, JJ, CF, MS and XM performed research; CB, JJ, EC, GM, JJP and XM analyzed data; CB, JJ, EC, GM, JJP and XM wrote the paper.

**The authors declare no conflict of interest.**

**ABSTRACT**

Laboratory mice have always been reported to be highly susceptible to virulent strains of *Yersinia pestis* in experimental model of bubonic plague. We have found that *Mus spretus* derived SEG/Pas (SEG) mice were exceptionally resistant to the virulent CO92 and 6/69 wild-type strains. Upon subcutaneous injection of  $10^2$  CFU, 90% of females and 68% of males survived, compared with less than 8% in C57BL/6 males or females. Furthermore, bacterial inocula as high as  $10^7$  CFU were unable to cause death in more than half of the inoculated SEG mice. Time to death in individuals that died of the infection was similar in the two strains, suggesting that survival is dependent on early rather than late processes. The analysis of 322 backcross mice revealed three significant QTLs on chromosomes 3, 4 and 6, with dominant SEG protective alleles. Each QTL increased survival rate by approximately 20%. The three QTLs acted in an additive manner, and together explained 67% of the difference between the parental phenotypes. Mice heterozygous for the three QTLs survived as well as SEG mice. The SEG strain therefore offers an invaluable opportunity to unravel mechanisms that allow to escape the lethal outcome following an acute and severe *Y. pestis* infection, and to identify underlying genetic factors.

**Keywords :** Plague, *Yersinia pestis*, resistance, mouse, *Mus spretus*

\body

## INTRODUCTION

*Yersinia pestis*, a Gram-negative bacterium, is the etiological agent of human bubonic and pneumonic plague. Starting from the bite of a *Y. pestis*-hosting flea, bubonic plague is characterized by the rapid multiplication of the bacteria in the bite site-draining lymph node, and is fatal in at least 50% of untreated cases, due to sepsis and multiple organ failure. Pneumonic plague results from the colonization of the lung by bacteria via infectious respiratory droplets. It is the most contagious and deadliest manifestation of the disease, with 100% mortality rate in the absence of effective antibiotherapy (1).

Although the current worldwide incidence of plague is low compared to historical records, the steady increase in reported human cases during the past 15 years coupled with its re-emergence in areas otherwise declared plague-free for several decades has led to classify plague as a re-emerging disease (2), a threat exacerbated by the recent identification of a antibiotic resistant strain (3). Moreover, the rapid disease progression with high mortality rate, the absence of efficient and safe vaccine, and the possibility of aerosol dispersion make *Y. pestis* a potential major tool for bioterrorism (4).

Historical records of plague pandemics indicate that a fraction of the individuals who developed bubonic plague were able to survive, suggesting that genetic factors of the mammalian host may also influence the outcome of the infection. It is likely that plague, which killed one third of the European population during the 1347-1351 Black Death, has exerted a rapid but strong selective pressure on the human genome. In animals, not all species are equally susceptible to plague. While most rodents, cats, camels and monkeys are susceptible, dogs and cows are usually resistant to *Y. pestis* (5). These differences in susceptibility could help understanding how *Y. pestis* overcomes and defeats the human immune system, and could also be used to predict which individuals are at risk, and to develop new strategies for therapeutic and vaccine interventions.

Using forward genetic approaches to decipher the genetic control of natural variation in host resistance to viral, parasitic or bacterial infections has already demonstrated its power to unravel the molecular mechanisms engaged in host-microbes interactions (6). The strength of this approach resides in its ability to identify previously unknown mechanisms, and characterize their hierarchy, interactions and individual contributions to infection pathogenesis. However, its power remains very limited in humans, in particular because *Y. pestis*-infected patients undergo antibiotic treatment which masks their intrinsic ability to

control the bacteria burden, the associated tissue damages and systemic inflammatory processes.

The availability of animal models relevant to human infectious diseases makes possible the identification of susceptibility genes under controlled experimental conditions in which strain, virulence, dose and route of *Y. pestis* inoculation are standardized. Among other rodents, mice are of special interest since they are naturally susceptible to plague (7), and they offer powerful genetic tools to identify susceptibility and resistance genes even when the trait is under complex genetic control. Genetic and phenotypic dissection, which is critical in untangling complex sequences of events with many participating tissues and cell types, can be achieved using congenic strains, in which specific genomic regions harboring a small group of genes are transferred between a susceptible and a resistant backgrounds.

Differences in susceptibility to *Y. pestis* have been recently reported between laboratory inbred strains of mice (8), including the mapping of two resistance alleles, close to the interleukin-10 gene (chromosome 1) (9) and histocompatibility complex (chromosome 17) (10). These results were obtained upon intravenous injection of the *Y. pestis* mutant strain KIM5 which lacks the chromosomal *pgm* locus. Since this strain is highly attenuated, it has to be given intravenously to cause a lethal infection. Direct penetration of the plague bacillus into the blood stream may occur during a flea bite but is very uncommon and is not the natural mode of infection. Similarly, the resistant phenotype observed with the attenuated strain disappeared when virulent *Y. pestis* strain was used (8), which limits the relevance of these results to natural infection of animals and humans.

In this study we report that, while all classical laboratory strains tested, such as C57BL/6 (B6), are susceptible to subcutaneous injection of fully virulent *Y. pestis* strain C092 (11), the SEG/Pas (SEG) inbred strain, which was established from *Mus spretus* progenitors, exhibits a high level of resistance in this experimental setting designed to mimic many features of the natural exposure. The genetic analysis of a large backcross cohort between SEG and B6 identified three dominant, additively acting loci which explain most of the difference of susceptibility observed between the two strains.

## RESULTS

**SEG mice resist virulent *Yersinia pestis*.** Several inbred strains of mice were tested for their ability to survive an infection with the fully virulent *Y. pestis* strain CO92. A subcutaneous (s.c.) injection of 100 colony-forming units (CFU) inoculum in the ventral region was lethal in 4-12 days for almost 100% B6 mice. This dose was used to challenge females of three additional laboratory inbred strains (FVB/N, BALB/cByJ and SJL/J), one *Mus musculus castaneus*-derived strain (CAST/Ei) and the *Mus spretus*-derived SEG strain (Fig. 1A). B6 and SEG mice were tested in several experiments; since results were consistent across experiments, the data were pooled.

SEG female mice displayed an outstandingly high level of survival (62 surviving mice out of 69 inoculated, i.e. 90%). By comparison, the survival rates of the other mouse strains varied from 0% (SJL, 0/9) to 23% (FVB/N, 5/22). Only 6.3% (7/111) of B6 mice survived the infection (Fig. 1A). Interestingly, the few SEG mice that succumbed to the infection did so with the same average time-to-death as B6 mice (Fig. 2). Although SEG mice developed symptoms characterized by a mild hypotonia and a reduced activity between days 4 to 6 post-inoculation, most of them recovered, except for a few ones which progressed towards marked depression and prostration, and finally died. In B6 mice, death often occurred rapidly after the appearance of the first symptoms.

To further evaluate the level of resistance of SEG mice to the fully virulent CO92 strain, groups of females received ten-fold dilutions ranging from  $10^3$  to  $10^7$  CFU of CO92 by the s.c. route. Remarkably, even the highest doses were unable to cause death in more than 50% of the mice (Fig. 1B). Time-to-death in susceptible SEG mice varied across groups, but was not correlated with the number of bacteria inoculated. We therefore concluded that the SEG strain exhibits an exceptional level of resistance to s.c. inoculation with fully virulent *Y. pestis*. Such a resistance has never been reported for any other mouse strain.

**Female SEG mice are more resistant than males.** B6 males and females inoculated s.c. with  $10^2$  CFU of strain CO92 exhibited the same high level of susceptibility (Fig. 1C). By contrast, SEG males were significantly less resistant ( $37/54 = 68.5\%$  survival) than females ( $62/69 = 89.9\%$ ;  $p = 0.005$ ). Since the difference of susceptibility between SEG and B6 strains was higher in females than in males, further studies, including genetic mapping of QTLs, were carried out on female mice.

**The exceptional resistance of SEG mice is not specific of *Y. pestis* strain CO92.** In order to assess whether the resistant phenotype of SEG mice was specific or not of the *Y. pestis* strain CO92 used in all experiments, we challenged B6 and SEG female mice with 100

CFU of another wild-type virulent strain, referenced 6/69 (12). Survival curves obtained with the two bacterial strains were similar (Fig. S1) which shows that SEG mice resistance is not strain specific.

**Survival of SEG mice is under multigenic control.** When a group of F1 females (n=16) were produced and challenged by s.c. inoculation of  $10^2$  CFU of strain CO92, 75% (12/16) of them survived, a resistance level not significantly lower than that of SEG mice ( $p=0.21$ ). This is suggestive of a dominant mode of inheritance for SEG-derived resistance alleles. An interspecific backcross was produced to characterize genetic regions controlling resistance of SEG mice. F1 females, born from the cross of B6 females and SEG males, were mated with B6 males to yield a BSB progeny, out of which 322 females were challenged s.c. with  $10^2$  CFU of *Y. pestis* CO92. Out of these BSB females, 190 survived the infection, giving a survival rate of 59%. This proportion was significantly lower than that of SEG mice ( $p=3.2 \cdot 10^{-7}$ ), but significantly higher ( $p=0.0015$ ) than the 50% expected if resistance was inherited as a simple Mendelian trait. From these data, we concluded that resistance of SEG mice to *Y. pestis* is under the control of multiple genes, likely with SEG alleles acting in a dominant fashion.

Time-to-death of susceptible BSB females was similar to that of B6 and SEG mice in both mean value and standard deviation (Fig. 2), suggesting that this cross did not segregate for genes controlling this trait. The QTL search was therefore focused on survival, analyzed as a binary trait.

SNP genotyping was performed using 721 polymorphic markers covering the entire genome of BSB females. QTL analysis using the R/qtl software, revealed the presence of three chromosomal regions significantly associated with survival on mouse chromosomes 3, 4 and 6 (Fig. 3). In all cases, the LOD curve reached the 5% genome-wide significance threshold computed by data permutation. These loci were named *Yprl1* (*Yersinia pestis* resistance locus-1), *Yprl2* and *Yprl3*, respectively. Their putative location was taken as the position of the marker with the highest LOD score value, and the confidence intervals were defined as the positions associated with one LOD unit fall-off from the curve peak. *Yprl1*, *Yprl2* and *Yprl3* were positioned at 116, 62 and 95 Mb on chromosomes 3, 4 and 6, respectively. Their confidence intervals were 57, 69 and 87 Mb long, respectively.

The individual effects of each QTL were assessed by the comparison of survival curves of BSB females depending on their genotype at the peak SNP marker. SEG allele at the *Yprl1* locus was associated with highly significant increase of resistance (Fig. 4A), rising from

48.5% in mice homozygous for the B6 allele, to 68.1% in B/S heterozygous mice. The effects of the *Yprl2* and *Yprl3* loci were similar in direction and magnitude (Fig. 4B and C).

Interactions between pairs of loci were investigated by comparing the survival rates of the four genotype combinations in two-locus effect plots. For example, the difference of survival between *Yprl2*<sup>B/B</sup> and *Yprl2*<sup>B/S</sup> mice was 21.1 % among the *Yprl1*<sup>B/B</sup> mice, while it was 18.0% among the *Yprl1*<sup>B/S</sup> mice (Fig. S2). Since these two values were not significantly different ( $p=0.97$ ), we concluded that the effect of *Yprl2* was independent of the genotype of the mice at *Yprl1*, and reciprocally. Similar observations were made with *Yprl1* - *Yprl3* and *Yprl2* - *Yprl3* pairs of QTLs, thus suggesting that the three QTLs add up their individual effects without epistasis.

We also searched for additional QTLs which could have remained undetected using the one-QTL search, because of epistatic interactions. The "scantwo" feature of R/qtl did not detect any additional locus significantly associated with survival.

***Yprl1*, 2 and 3 act additively to confer survival in BSB mice.** As the three QTLs appear to act independently from one another, we investigated the level of resistance of BSB mice for each of the eight possible genotype combinations at the three loci (Fig. 5). This analysis was made possible by the large size of the cross which resulted in group sizes of at least 33 individuals. Groups were sorted by increasing proportion of SEG alleles at the three QTLs. The distribution of survival rates across groups was compared to that of B6 and SEG. Mice heterozygous for the SEG allele at the three QTLs show a level of resistance similar to that of SEG (82.7% and 89.9%, respectively). Conversely, mice homozygous for the B6 allele at the three QTLs had the lowest level of resistance (27.0%), but were significantly less susceptible than B6 mice ( $p=0.0017$ ). The other groups of BSB mice showed intermediate levels of resistance, and the groups of mice heterozygous for only one QTL were globally more susceptible than those heterozygous for two QTLs (48.5% and 68.0% survival, respectively;  $p = 0.0043$ ).

From this analysis, we concluded that (1) SEG resistance alleles are dominant over B6 susceptibility alleles. (2) The three QTLs act in an additive manner. Together, they explain 67% of the phenotypic difference between the two parental strains. (3) These QTLs can provide BSB mice with up to the same level of resistance as SEG mice. (4) There remain undetected QTLs able to induce a significant level of resistance even in the absence of the three *Yprl* loci.

## DISCUSSION

Although plague is no longer a major threat for human populations, the recent re-emergence of the disease in several countries (2), the isolation of antibiotic resistant strains (3), and the exceptional pathogenicity of *Y. pestis* fully justify studies aimed at unravelling the mechanisms by which this bacterium is able to induce so efficiently and rapidly a deadly infection of its host. The mouse is a relevant animal model to explore the pathophysiology of plague owing to the fact that it is a natural and susceptible host for *Y. pestis*. Most studies published until now have explored the bubonic form of the disease, although a model for primary pneumonic plague has been recently described and investigated (13).

The majority of *in vivo* genetic studies published so far on mouse models have focused on the role of *Y. pestis* genetic determinants on the bacterial load and histological damages in different host tissues (14, 15). However, two recent reports described the identification of genetic regions of the mouse genome associated with variable susceptibility of classical inbred mouse strains to *Y. pestis*. The first study showed that the previously reported resistant phenotype of *Il10* knock-out mice was partially due to a closely linked resistance allele inherited from the 129/P2J genetic background of the ES cells used for gene targeting (9). The second study described the resistant phenotype of the BALB/cJ strain, compared to the susceptibility of other BALB/c substrains, and of C57BL/6J. Using a combination of backcross and intercross, a QTL was mapped in the *H2* region, on proximal chromosome 17 (10). However, both studies were performed using the attenuated *Y. pestis* strain KIM5 which lacks the *pgm* locus, an important virulence factor (16). This deletion requires that inoculation of *Y. pestis* be performed intravenously, a route that ensures rapid dissemination of the bacteria, but that bypasses several important processes, in particular those deploying in the skin and the draining lymph node.

In this study, we aimed at identifying host genetic determinants of resistance to plague, under experimental conditions closer to the natural infection, i.e. using a wild-type, fully virulent *Y. pestis* strain and a subcutaneous route of infection. We took advantage of our collection of wild-derived strains maintained at the Institut Pasteur to explore broad mouse genetic diversity. This strategy had proven successful previously in our hands, with the identification of *Oas1b* gene as a major determinant of resistance to West Nile virus (17). Indeed, while almost all laboratory inbred strains are highly susceptible to this virus due to a point mutation in the *Oas1b* gene, all wild-derived strains are highly resistant and carry a functional allele.

In the present study, all strains tested, including *Mus m. castaneus* CAST/EiJ, were found to be susceptible to plague, except *Mus spretus* derived SEG strain which exhibited an outstandingly high level of resistance. Even very high bacterial inocula were unable to cause death in more than 50% of the mice. One possible explanation for the high dose resistance of SEG mice could be genetic heterogeneity in the breeding colony, with a mutation conferring complete resistance to high doses segregating in a low dose-resistant inbred genetic background. However, careful analysis of the pedigree of the SEG mice used in this experiment ruled out this possibility. Another explanation might be a dose-dependent stimulation of the SEG innate immune response, and a capacity of these mice to clear the bacteria that never reaches saturation.

We have identified for the first time a mouse strain that displays high level of resistance to the inoculation with fully virulent *Y. pestis* strains, opening a double perspective to better understand the interactions between this highly pathogenic bacterium and its host. First, having a highly resistant and a very susceptible strains of mice is an invaluable resource to identify the mechanisms, especially during the early phases following *Y. pestis* inoculation, which are triggered or disengaged by *Y. pestis*, and influence the outcome of host-pathogen interactions. Second, genes controlling this difference can be identified by QTL mapping in two generations, although interspecific crosses between *Mus spretus* and laboratory strains invariably result in sterile F1 males, which prevents from producing F2 progeny. This forward genetic strategy has already proven successful for the identification of key genes for the control of bacterial, viral or parasitic diseases (6).

An interspecific backcross using SEG and B6 as parental strains was therefore produced. We analyzed more than 300 females since we suspected that SEG resistance was not controlled by a single gene, and that scoring the phenotype as a binary (death or survival) trait, resulting from a complex series of host-bacteria interactions, could result in reduced power for QTL detection. Nonetheless, we identified three significant QTLs controlling survival rate. Each of them was able, in the context of the segregating background of BSB mice, to confer a 20% increase of survival, from 48 to 68% on average. Moreover, pair-wise analysis of QTL effects revealed an additive mode of action. Subsequently, the survival rate of BSB mice increased as a function of the SEG alleles carried at the three QTLs, and mice heterozygous at *Ypr11*, 2 and 3 displayed the same level of resistance as SEG mice (Fig. 5). However, since mice homozygous for the B6 allele at the three QTLs were significantly more resistant than B6 mice, there remain other resistance genes to be identified, which may be too numerous, or may have too weak effects to be detectable in a cross of this size.

Taken together, these data suggest a model for the resistance to *Y. pestis* virulent strains in SEG mice (Fig. 6). The B6 strain has a very weak ability to resist *Y. pestis*, which results most frequently in the rapid death of the mice. One or more yet unidentified loci provide increase resistance to a level where approximately 30% of mice eventually survive the infection. The three *Yprl* loci mapped in our study improve resistance further, up to the level of SEG mice. However, we cannot predict what the survival rate provided by the three *Yprl* loci would be in the absence of the unidentified loci. It is possible that these unknown loci play a critical role and create a genomic context favourable to the action of the *Yprl* loci, so that strains congenic for only one or the other of the *Yprl* loci may not show a significant increase in survival rate compared with B6.

Confidence intervals of the *Yprl1*, 2 and 3 loci encompass large chromosomal regions (between 57 and 87 Mb), which prevents any reasonable assumption on the identity of the causative genes. Each of these regions contains genes involved in the immune response which could be valuable candidates. Because of their dominant mode of inheritance, it is likely that the SEG resistance alleles are gain-of-function variants.

The survival curves of the mice which died of the infection showed exactly the same decrease over time, across the B6, SEG and BSB populations (Fig. 2). This observation suggests that, in the mice which will finally succumb to the *Y. pestis* challenge, the disease course is very similar in these three contrasted genetic backgrounds, and that the final outcome of the infectious process depends on events taking place during the first two or three days, before the first mice die.

*Mus spretus* is a mouse species which has diverged from the *Mus musculus* group of subspecies more than 1 MY ago (18). The genetic divergence between them at the nucleotide level is estimated to be 1 to 1.5%, the same order of magnitude as between human and chimpanzee. Our observation of the exceptional resistance of SEG mice to *Y. pestis* illustrates the usefulness of *Mus spretus* derived strains as a source of genetic and phenotypic polymorphism (19). The fact that the difference of susceptibility to plague between B6 and SEG strains is under the control of multiple genes with additive effects stands in contrast with other infectious diseases in which single gene mutations with major effects were identified. In the case of *Oas1b*, a nonsense mutation was probably present in the very early founders of the laboratory strains, and became fixed by chance, i.e. without any selective pressure, in the vast majority of these strains (17). This mutation has not yet been found in inbred strains derived from progenitors of different *Mus musculus* subspecies. In the case of plague, the highly resistant phenotype of the SEG strain results from the accumulation of several gain-of-

function genetic variations, each of which provides a moderate but significant advantage in the control of *Y. pestis* proliferation and systemic dissemination. The acquisition of this phenotype may have resulted from selective pressure exerted by endemic exposure to *Y. pestis*-hosting fleas in wild rodents.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice and crosses.** SEG/Pas was first bred as a closed colony by François Bonhomme in Montpellier, France, from *Mus spretus* progenitors trapped in Spain, near Granada (18). It was later established as an inbred strain and maintained since 1995 at the Institut Pasteur. C57BL/6 (B6), FVB/NCrl, BALB/cByJ and SJL/JOrlCrl mice were purchased at 6 weeks of age from Charles River Laboratory (L'Arbresle, France). They were maintained for at least three weeks in the Institut Pasteur animal facilities prior to inoculation. CAST/Ei mice were bred at the Institut Pasteur from progenitors purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). To produce  $\underline{B6} \times (\underline{SEG} \times \underline{B6})$ F1 backcross mice (BSB), SEG males were mated with B6 females and the resulting F1 females were mated with B6 males. All animal experiments were approved and conducted in accordance with the Institut Pasteur Biosafety Committee. Mice were kept in isolators after inoculation. They were given food and water ad libitum and were kept at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  with alternating 12h periods of light and dark.

**Culture of *Yersinia pestis* strains and experimental infections of mice.** Experimental infections were performed using the virulent *Y. pestis* strains CO92 (11) and 6/69 (12). Cultures were carried out at  $28^\circ\text{C}$  for 48h on LB agar medium supplemented with 0.2% (W/v) hemin (LBH). Bacteria were collected and suspended in saline. Bacterial concentration was estimated by spectrometry at 600 nm (1 O.D.  $\sim 10^9$  CFU/ml) and confirmed by colony-forming units (CFU) counts on LBH agar plates. Mice were s.c. injected between 8 and 12 weeks of age, in the ventral region, with a 100  $\mu\text{l}$  inoculum. They were monitored daily for 14 days.

**Genotyping.** Tail biopsies were collected at weaning from BSB mice and high-quality DNA was prepared by standard phenol-chloroform extraction. For BSB genotyping, 1,536 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were genotyped at the *Centre National de Génotypage* (Evry, France) using the Illumina GoldenGate platform. A total of 721 markers covering the entire mouse genome were polymorphic and gave reliable genotypes.

**Statistical and QTL analysis.** Survival curves were compared by a logrank (Mantel-Cox) test using StatView 5.0 (SAS Institute Inc, Cary NC). Survival rates were compared by

Fisher's exact test. QTL analysis was performed by using the R/qtl software version 1.07-12 running under R 2.6.0 (20). The survival rate was analyzed as a binary trait. Significance thresholds of LOD scores were estimated by 1,000 permutations of experimental data, and were 2.77 and 2.43 for 5% and 10% thresholds, respectively.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

CB is a recipient of a DGA (*Délégation Générale pour l'Armement*) fellowship. This work was supported by a grant from Aventis Pharma (Sanofi-Aventis group) and Bayer Pharma as part of a multi-organism call for proposal. We thank Jean-Louis Guénet for his constant interest and challenging discussions. We are very grateful to Isabelle Lanctin for careful breeding of the SEG/Pas colony, and to the CNG (*Centre National de Génotypage*) for the SNP genotyping of BC mice.

## REFERENCES

1. Titball RW & Williamson ED (2001) Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine* 19(30):4175-4184.
2. Schrag SJ & Wiener P (1995) Emerging infectious diseases: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends Evolution and Ecology* 10:319-324.
3. Galimand M, *et al.* (1997) Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med* 337(10):677-680.
4. Inglesby TV, *et al.* (2000) Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama* 283(17):2281-2290.
5. Perry RD & Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10(1):35-66.
6. Vidal SM, Malo D, Marquis JF, & Gros P (2008) Forward genetic dissection of immunity to infection in the mouse. *Annu Rev Immunol* 26:81-132.
7. Pollitzer R (1954) Plague. *W.H.O. Monograph Series 22. World Health Organization, Geneva, Switzerland.*
8. Congleton YH, Wulff CR, Kerschen EJ, & Straley SC (2006) Mice naturally resistant to *Yersinia pestis* Delta pgm strains commonly used in pathogenicity studies. *Infect Immun* 74(11):6501-6504.
9. Turner JK, Xu JL, & Tapping RI (2009) Substrains of 129 mice are resistant to *Yersinia pestis* KIM5: implications for interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 77(1):367-373.
10. Turner JK, McAllister MM, Xu JL, & Tapping RI (2008) Resistance of BALB/cJ mice to *Yersinia pestis* maps to the major histocompatibility complex of chromosome 17. *Infect Immun.*
11. Doll JM, *et al.* (1994) Cat-transmitted fatal pneumonic plague in a person who traveled from Colorado to Arizona. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51(1):109-114.
12. Buchrieser C, Prentice M, & Carniel E (1998) The 102-Kilobase Unstable Region Of *Yersinia Pestis* Comprises a High-Pathogenicity Island Linked to a Pigmentation Segment Which Undergoes Internal Rearrangement. *Journal of Bacteriology* 180(9):2321-2329.
13. Lathem WW, Crosby SD, Miller VL, & Goldman WE (2005) Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(49):17786-17791.
14. Leary SEC, *et al.* (1999) *Yersinia* outer proteins (YOPS) E, K and N are antigenic but non-protective compared to V antigen, in a murine model of bubonic plague. *Microbial Pathogenesis* 26(3):159-169.
15. Lindler LE, Klempner MS, & Straley SC (1990) *Yersinia pestis* pH-6 Antigen - Genetic, Biochemical, and Virulence Characterization of a Protein Involved in the Pathogenesis of Bubonic Plague. *Infection and Immunity* 58(8):2569-2577.
16. Leal-Balbino TC, *et al.* (2006) The pgm locus and pigmentation phenotype in *Yersinia pestis*. *Genetics and Molecular Biology* 29(1):126-131.
17. Mashimo T, *et al.* (2002) A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17):11311-11316.
18. Guénet JL & Bonhomme F (2003) Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet* 19(1):24-31.
19. Dejager L, Libert C, & Montagutelli X (2009) Thirty years of *Mus spretus*: a promising future. *Trends Genet* 25(5):234-241.

20. Broman KW, Wu H, Sen S, & Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19(7):889-890.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Survival, over a 14-day period, of various mouse inbred strains following inoculation with virulent *Y. pestis* strains CO92 or 6/69. (A)  $10^2$  CFU of strain CO92 were injected to groups of SEG (N=69), FVB/N (N=22), BALB/cByJ (N=21), CAST/Ei (N=10), B6 (N=111) and SJL/J (N=9) females. (B) Groups of SEG females were inoculated with  $10^2$  (N=8),  $10^3$  (N=6),  $10^4$  (N=11),  $10^5$  (N=15),  $10^6$  (N=16) and  $10^7$  (N=6) CFU of strain CO92. (C) Comparison of susceptibility of male and female B6 (N=16 and N=111, respectively) and SEG (N=54 and N=69, respectively) mice following inoculation with  $10^2$  CFU of strain CO92. SEG females were more resistant than males (shown with bracket; 62/69 and 37/54, respectively;  $p=0.005$ ). Large groups (N>25) result from the pooling of several experiments.

**Fig. 2.** Survival curves of the B6 (N=104), SEG (N=7) and BSB (N=132) female mice that died of the *Y. pestis* infection. Time-to-death did not differ, either in mean, or in variability, across the three groups.

**Fig. 3.** QTL mapping of survival rate on 322 BSB females, showing three significant QTLs on chromosomes 3 (*Yprl1*), 4 (*Yprl2*) and 6 (*Yprl3*). Dashed lines denote thresholds of significance ( $p = 0.1$  and  $p = 0.05$ , permutation test).

**Fig. 4.** Survival curves of BSB females showing the effect of the genotype at the marker at the peak LOD score of each QTL. (A) *Yprl1* : Chromosome 3 @ 116Mb; B/B : N = 139; B/S : N = 182. (B) *Yprl2* : Chromosome 4 @ 62Mb; B/B : N = 159; B/S : N = 160. (C) *Yprl3* : Chromosome 6 @ 95Mb; B/B : N = 148; B/S : N = 174. Significance values were calculated from Fisher's exact test on survival rates.

**Fig. 5.** Survival rate of B6, BSB and SEG females according to their haplotype at the *Yprl1*, *Yprl2* and *Yprl3* QTLs (same markers as in Fig. 4), and their genetic background. Top table gives the genotype of each group at the three QTLs and genetic background. White box : B/B; grey box : B/S; black box : S/S. Split boxes depict loci for which fully genotyped BSB animals were either B/B or B/S. The graph shows the survival rate (with one standard deviation error bars) of each group. The difference between the two leftmost groups reflects the effect of unidentified QTLs. Mice heterozygous for *Yprl1*, *Yprl2* and *Yprl3* show the same survival rate as the SEG strain.

**Fig. 6.** A model illustrating the additive effects of *Yprl1*, *Yprl2* and *Yprl3* on the survival to a *Y. pestis* challenge. Unidentified QTLs provide some resistance mechanisms which result in ~19% increase of survival rate compared to B6J. Each of *Yprl1*, *Yprl2* and *Yprl3* provides, when B/S heterozygous, an additional ability to survive the infection, up to the survival rate observed in SEG mice.

**LEGENDS TO SUPPORTING FIGURE**

**Fig. S1.** Comparison of susceptibility of B6 and SEG females to  $10^2$  CFU of strain CO92 (N=111 and N=69, respectively) and of strain 6/69 (N=9 and N=16, respectively). Large groups (N>25) result from the pooling of several experiments.

**Fig. S2.** Two-locus effect plots showing the effect of one QTL conditioned on the genotype at the other QTL. For each combination of genotypes, survival rate is given with one standard deviation error bars. The interaction between the two loci was tested by two-way ANOVA after arcsine transformation of the survival rates. (A) *Yprl1* and *Yprl2*, p(interaction) = 0.97. (B) *Yprl1* and *Yprl3*, p(interaction) = 0.38. (C) *Yprl2* and *Yprl3*, p(interaction) = 0.11.

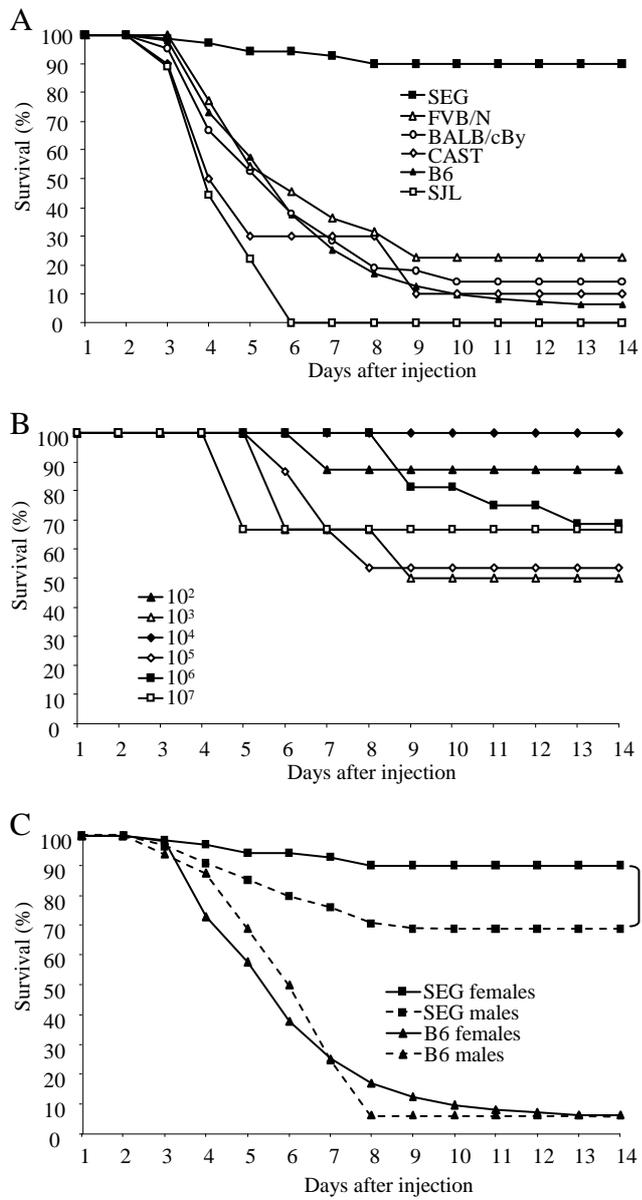


Figure 1

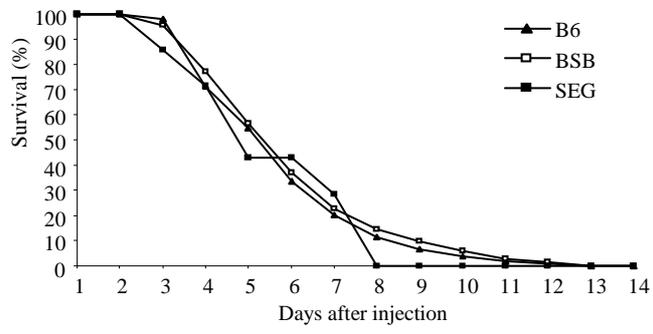


Figure 2

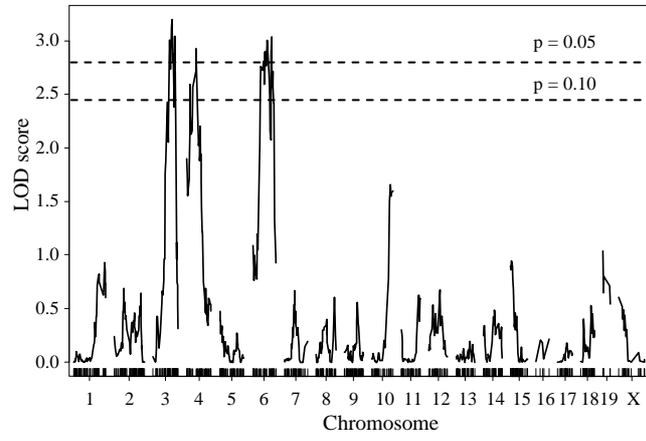


Figure 3

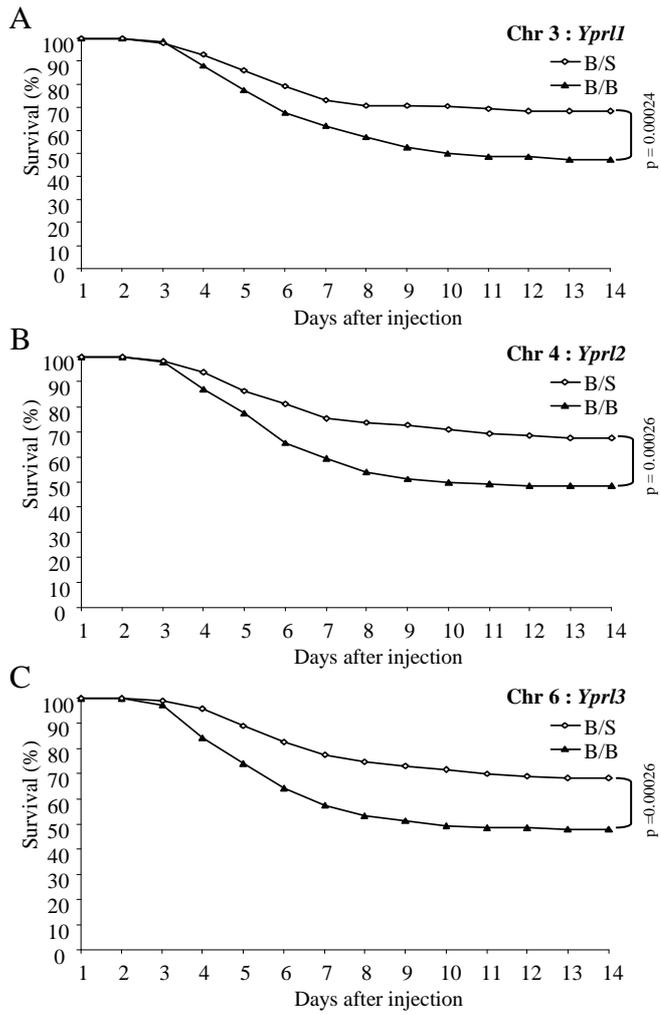


Figure 4

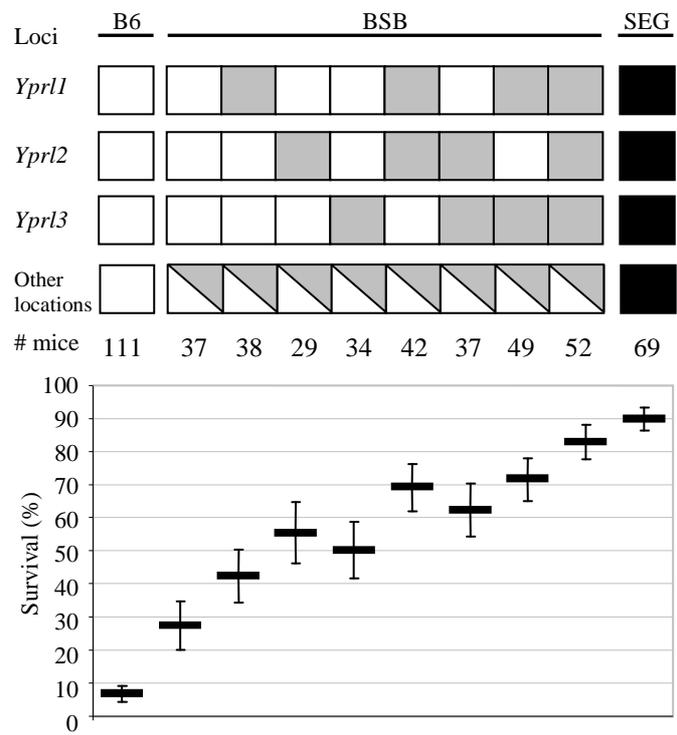


Figure 5

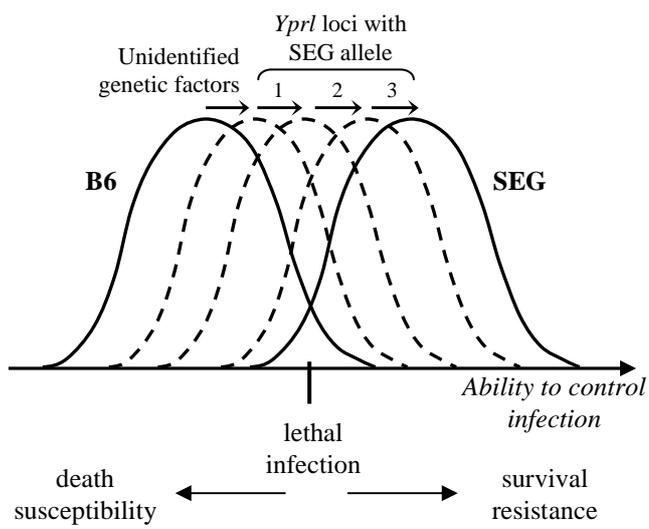
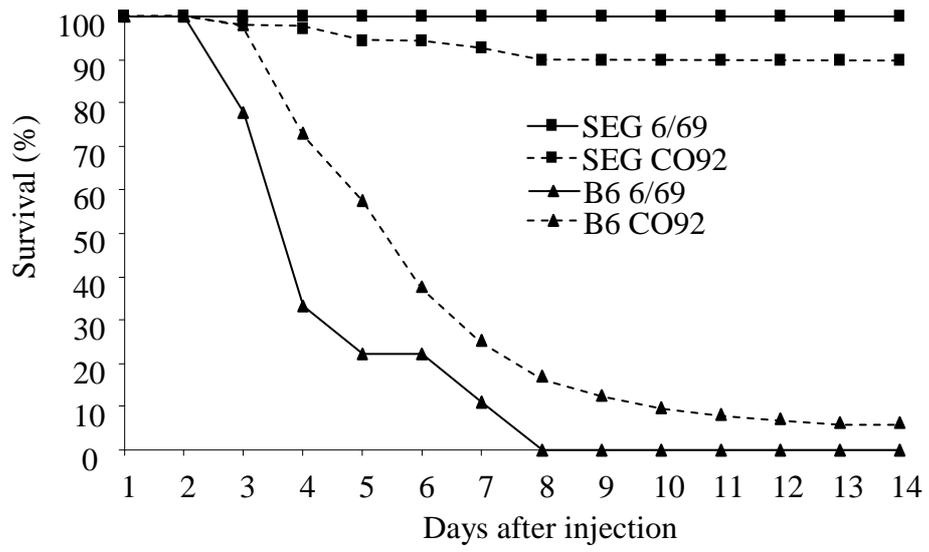
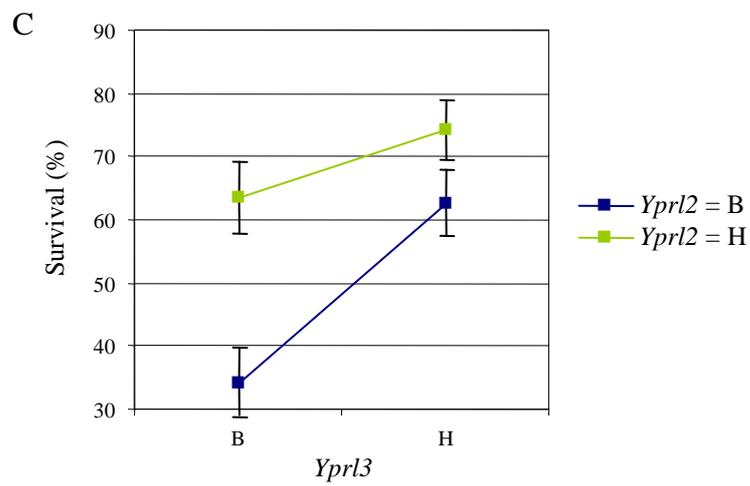
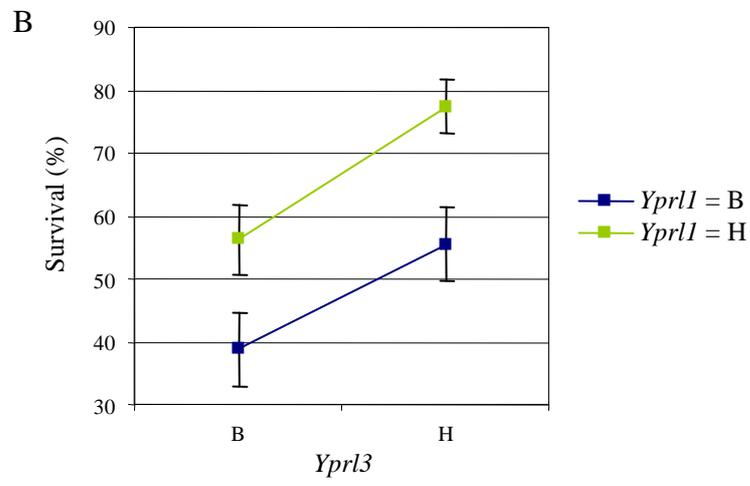
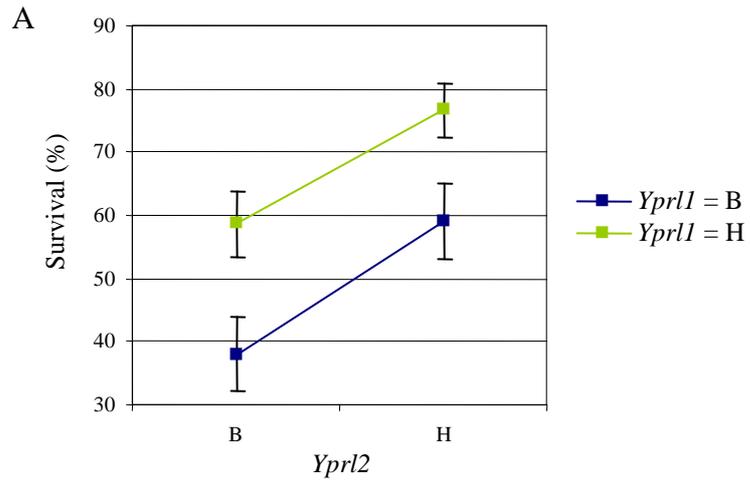


Figure 6



Supporting figure 1



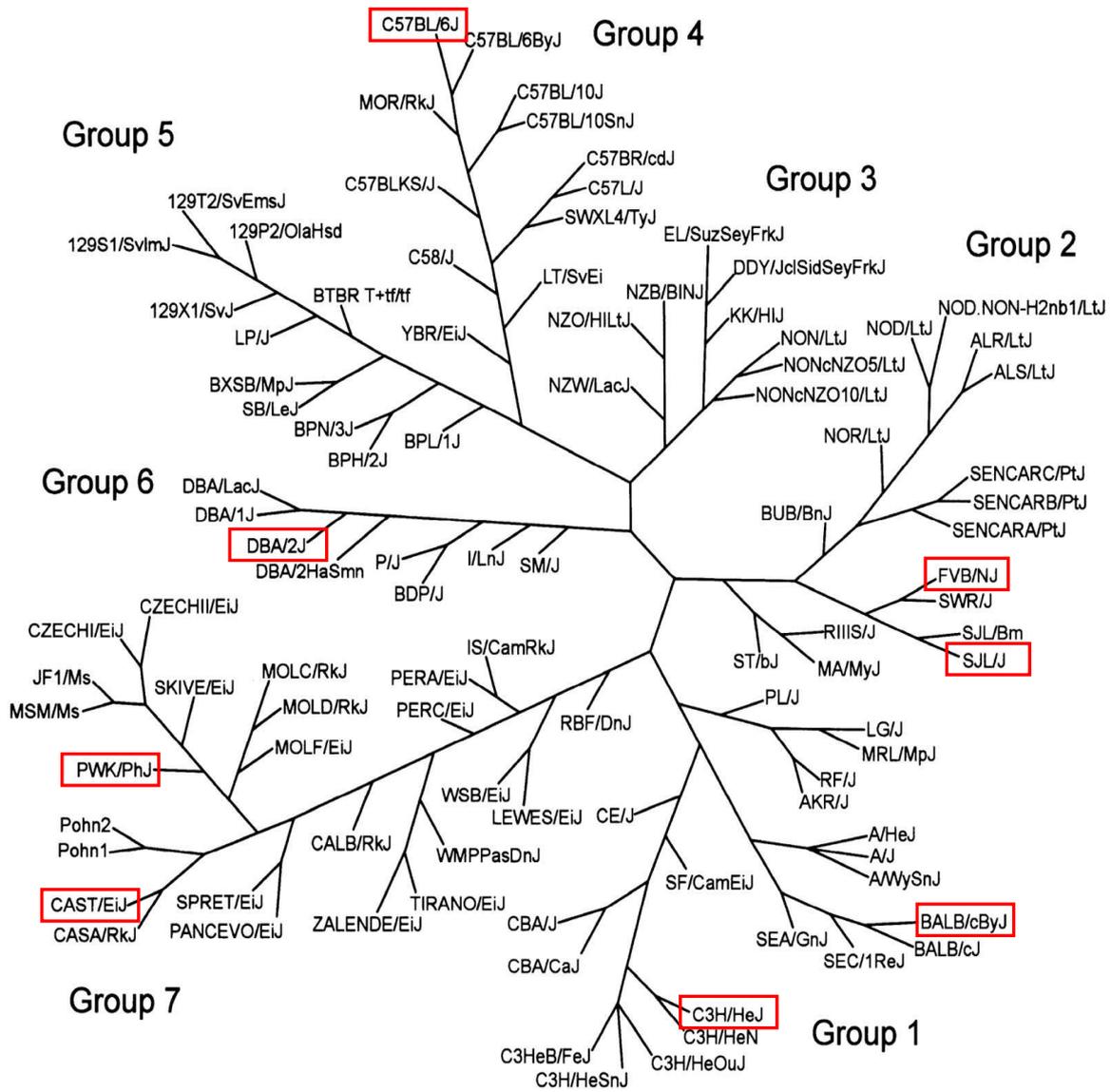
Supporting figure 2

### 3.4. Recherche d'autres lignées sensibles ou résistantes à l'infection par *Y. pestis*

Nous avons testé la vulnérabilité d'une série de lignées de souris de laboratoire et de souris sauvages dans les conditions expérimentales définies ci-dessus. Nous avons choisi les lignées de laboratoire de façon à couvrir la plus vaste diversité génétique possible, en nous basant sur l'arbre phylogénique décrit par Petkov et coll. (figure 12) (Petkov *et al.*, 2004). Nous avons testé les lignées de laboratoire C57BL/6J, BALB/cByJ, C3H/HeJ, FVB/N, SJL/J, et DBA/2J, ainsi que les lignées sauvages CAST/Ei (*Mus m. castaneus*), PWD/PhJ, PWK/PhJ et MBT/Pas (*Mus m. musculus*). Les lignées PWD/PhJ, PWK/PhJ C3H/HeJ et DBA/2J ont montré une variabilité importante entre les différentes expériences. Par conséquent, d'autres animaux devront être testés avant de pouvoir conclure définitivement de leur vulnérabilité. Toutes les autres lignées testées se sont révélées sensibles à l'infection (figure 13a), avec un taux de survie inférieur ou égal à 23%.

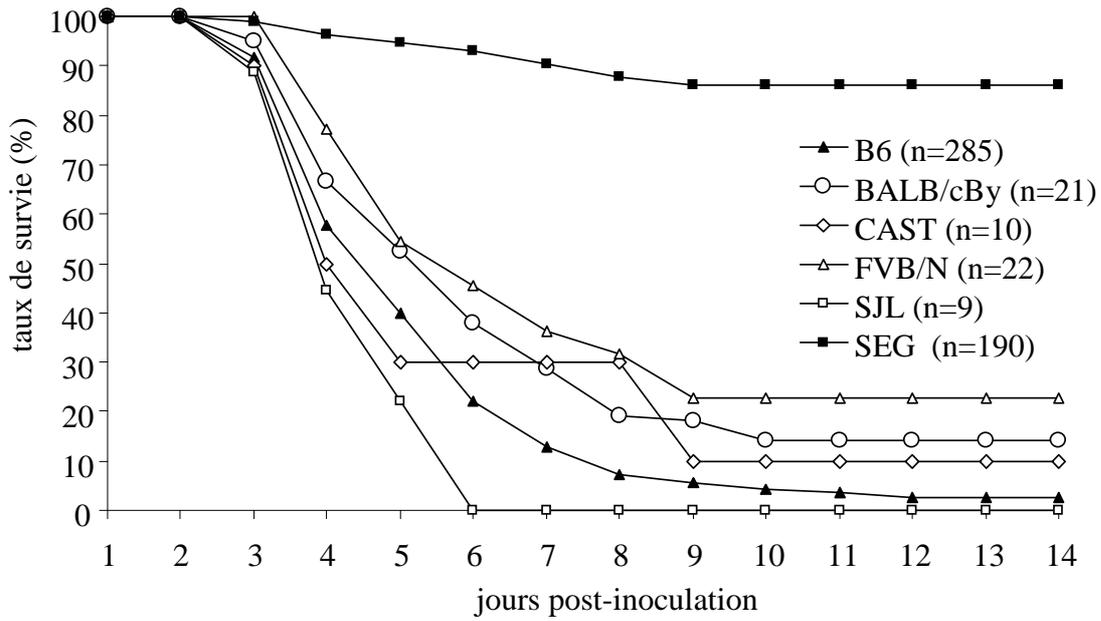
Il existe plusieurs colonies plus ou moins consanguines dérivées à partir d'individus capturés à différents endroits sur le pourtour occidental du bassin méditerranéen. La plupart de ces colonies sont entretenues à l'Institut des Sciences de l'Evolution à Montpellier, sous la direction du Pr F. Bonhomme qui a capturé la plupart des individus fondateurs. Pour savoir si le phénotype de résistance observé pour la lignée SEG/Pas (dont les fondateurs sont originaires de Grenade, en Espagne) lui était spécifique ou était partagé par d'autres lignées *Mus spretus*, nous avons testé les lignées SFM/Mpl (Montpellier), SEB/Mpl (Barcelone), STF/Pas (Fondouk Djedid, Tunisie) et SMZ/Mpl (Azemmour, Maroc).

Les lignées SMZ et SEB ont montré des taux de survie similaires à celui de la lignée SEG/Pas. En revanche, la lignée STF s'est révélée aussi sensible que la lignée de laboratoire C57BL/6. La lignée SFM a montré un phénotype intermédiaire (figure 13b).

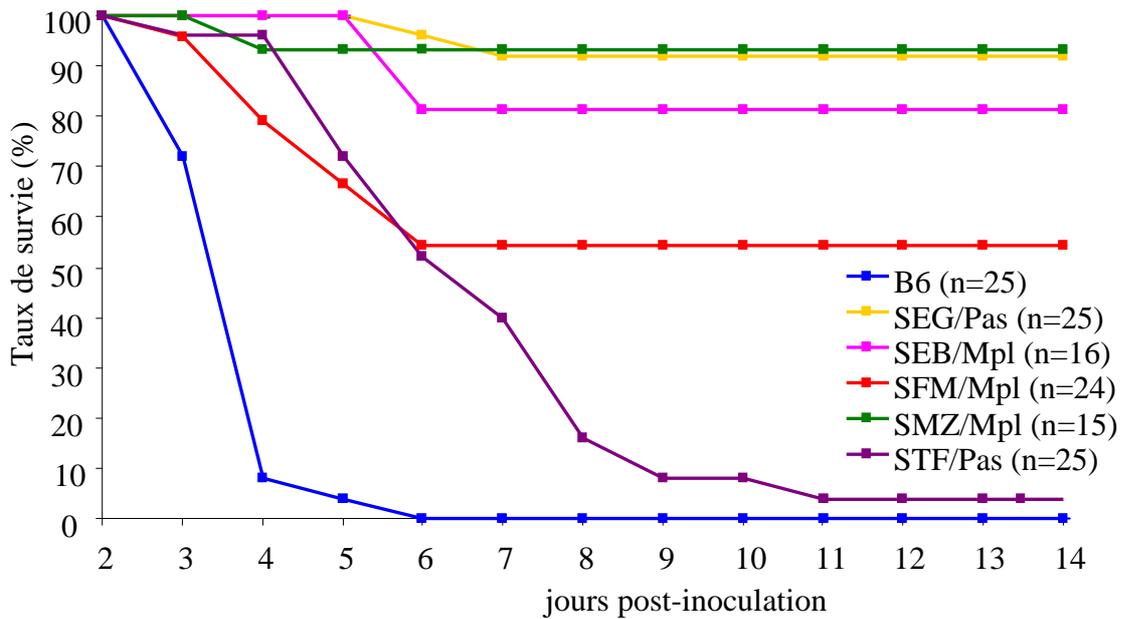


**Figure 12 : Arbre phylogénique des différentes lignées de souris établi sur la base du polymorphisme de 1638 SNPs (Petkov et al., 2004). En rouge sont encadrées les lignées de souris testées avec 100 cfu de *Y. pestis* CO92.**

a



b



**Figure 13 : Courbe de survie des différentes lignées de souris inoculées par 100 cfu de *Y. pestis* CO92.**

(a) Comparaison de B6 et SEG avec trois lignées de laboratoire et une lignée *M. m. castaneus* (CAST/Ei); (b) Comparaison de B6 et SEG avec quatre autres lignées d'origine *Mus spretus*.

### 3.5. Recherche de QTL dans des croisements interspécifiques

#### 3.5.1. Croisement (C57BL/6 x SEG)F1 x C57BL/6

##### 3.5.1.1. *Résumé des résultats présentés dans l'article*

Un premier croisement en retour interspécifique entre les lignées C57BL/6 et SEG a été produit. Il comportait au total 540 individus. Les résultats figurant dans la première publication, sont rappelés brièvement ici :

- les souris (C57BL/6 x SEG)F1 présentent une résistance intermédiaire entre celle des deux lignées parentales (62%);

- les (C57BL/6 x SEG)F1 x C57BL/6 (BSB) présentent une résistance du même ordre que celle des F1 (70%);

- le contraste entre les deux lignées parentales étant plus important chez les femelles que chez les mâles, l'analyse du croisement a porté sur les femelles;

- après génotypage pour 720 marqueurs SNP ou microsatellites informatifs, l'analyse des 322 femelles BSB a mis en évidence l'existence de 3 QTL contrôlant la probabilité de survie sur les chromosomes 3, 4 et 6, appelés respectivement *Ypr11*, *Ypr12* et *Ypr13* (*Yersinia pestis* *resistance locus*); dans les trois cas, l'allèle SEG augmente le taux de survie;

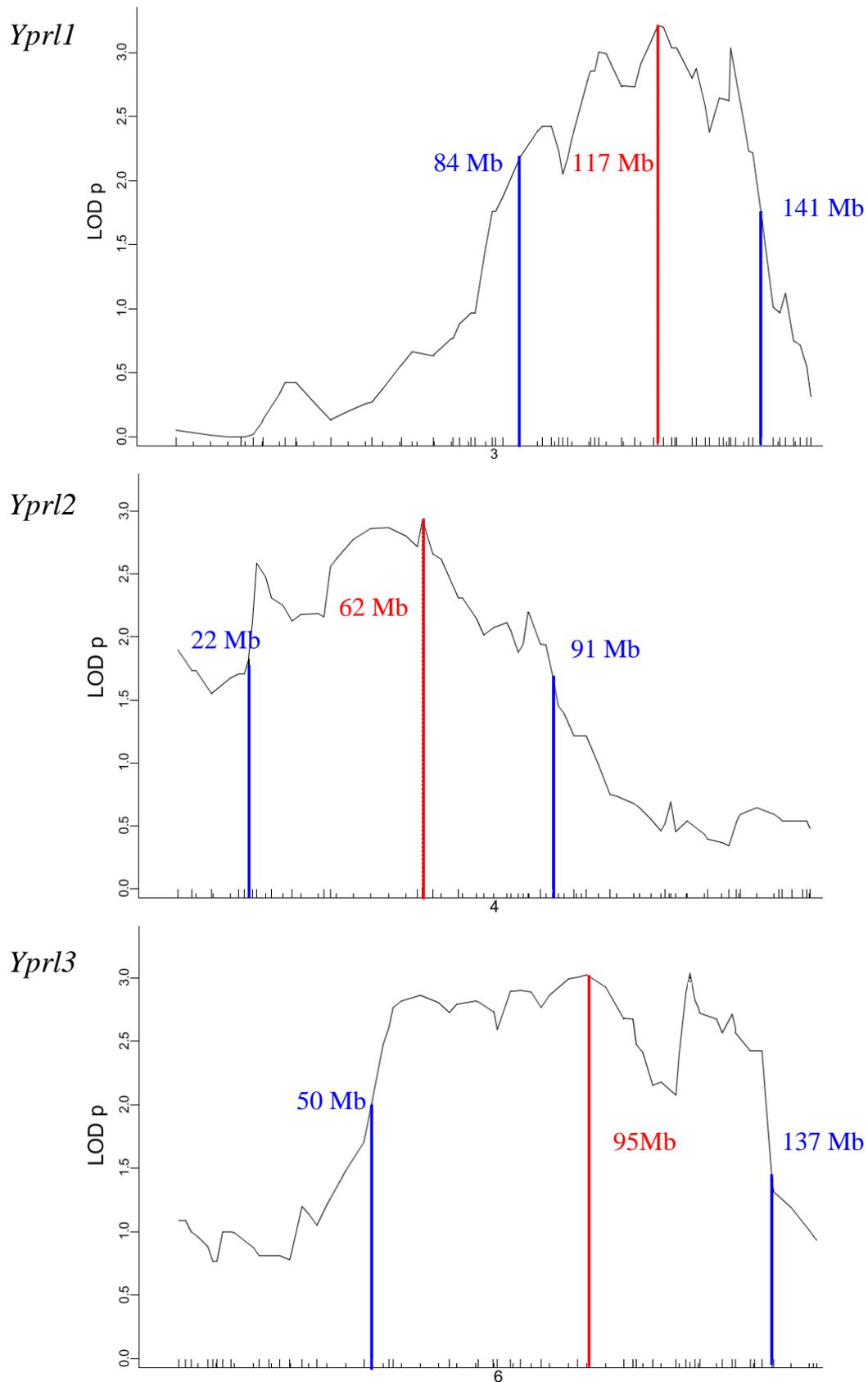
- ces trois QTL agissent de façon additive sur le taux de survie et les femelles, hétérozygotes pour les trois locus à la fois, présentent un taux de survie analogue à celui de SEG/Pas;

- aucun QTL n'a été trouvé en ce qui concerne le nombre de jours séparant l'infection de la mort (la latence).

##### 3.5.1.2. *Analyses complémentaires*

Les intervalles de confiance des 3 QTL identifiés ont été calculés en prenant comme seuil une unité en dessous du pic de LOD score. Les intervalles de confiance ainsi calculés ont une taille de 57 Mb (*Ypr11*, chromosome 3), 69 Mb (*Ypr12*, chromosome 4) et 87 Mb (*Ypr13*, chromosome 6, figure 14).

L'analyse des 218 mâles du même croisement en retour a montré qu'ils présentent le même taux global de survie que les femelles (respectivement  $58 \pm 6,2\%$  et  $65 \pm 6,2\%$ ). Un seul



**Figure 14 : Intervalles de confiance des 3 QTL identifiés chez les femelles.** La ligne rouge correspond au point culminant du QTL. Les lignes bleues correspondent aux bornes inférieure et supérieure des intervalles. Les positions en Mb sont indiquées pour chacune des bornes et des points culminants des QTL.

QTL, co-localisé avec *Yprl3*, a été identifié. Il contrôle aussi uniquement la probabilité de survie des animaux et possède un intervalle de confiance de 35 Mb (figure 15). Les mâles hétérozygotes B/S au locus *Yprl3* présentent un taux de survie comparable à celui des mâles SEG/Pas (figure 16). En revanche, les individus homozygotes B/B ont un taux de survie très supérieur à celui des mâles C57BL/6, ce qui indique l'existence d'autres gènes. Toutefois, aucun autre QTL significatif n'a été mis en évidence chez les mâles, que ce soit pour le taux de survie ou pour la latence. En particulier, les locus *Yprl1* et *Yprl2* n'ont pas été retrouvés et sont donc spécifiques des femelles (figure 17).

Dans le but d'identifier d'éventuelles interactions épistatiques entre différentes régions chromosomiques, nous avons recherché des paires de locus dont les effets ne seraient révélés que par une analyse conjointe. L'utilisation de la fonction scantwo de R/qtl a permis d'identifier plusieurs associations présentant des interactions épistatiques mais aucune n'a franchi le seuil de significativité calculé par permutation de données. Nous avons conclu qu'il existe probablement plusieurs gènes à effet faible dont nous détectons l'effet cumulé chez les individus BSB, mais que le nombre d'animaux analysés ne nous a pas permis d'identifier.

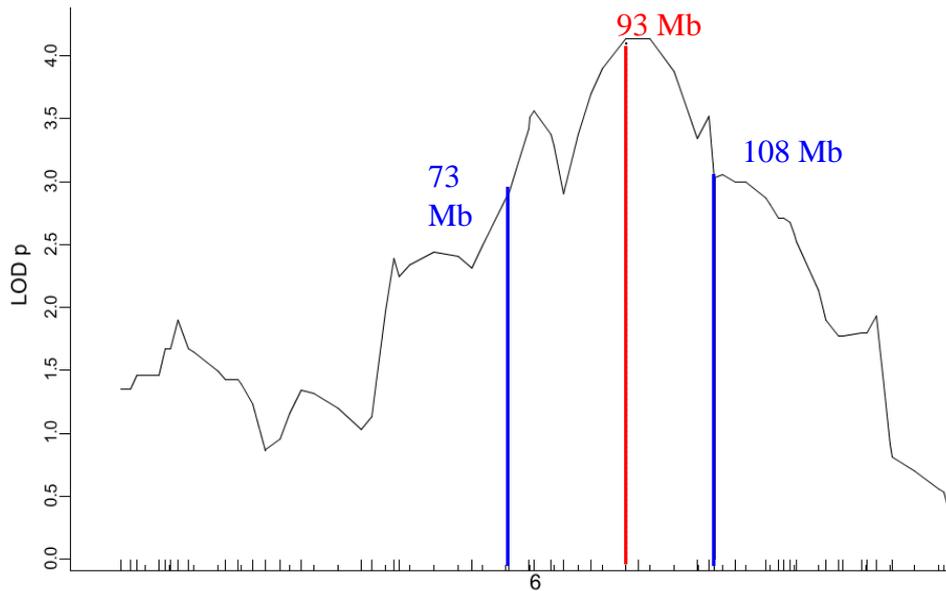
### 3.5.2. Croisement (C57BL/6 × SEG)F1 × SEG

Nous avons aussi produit un croisement en retour symétrique, en croisant des femelles F1 avec des mâles SEG/Pas. Ce croisement BSS a produit au total 122 individus qui ont été phénotypés dans nos conditions standards. Le génotypage a été effectué à l'aide de 70 marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du génome, en n'analysant dans un premier temps que les 39 souris sensibles et 55 souris résistantes.

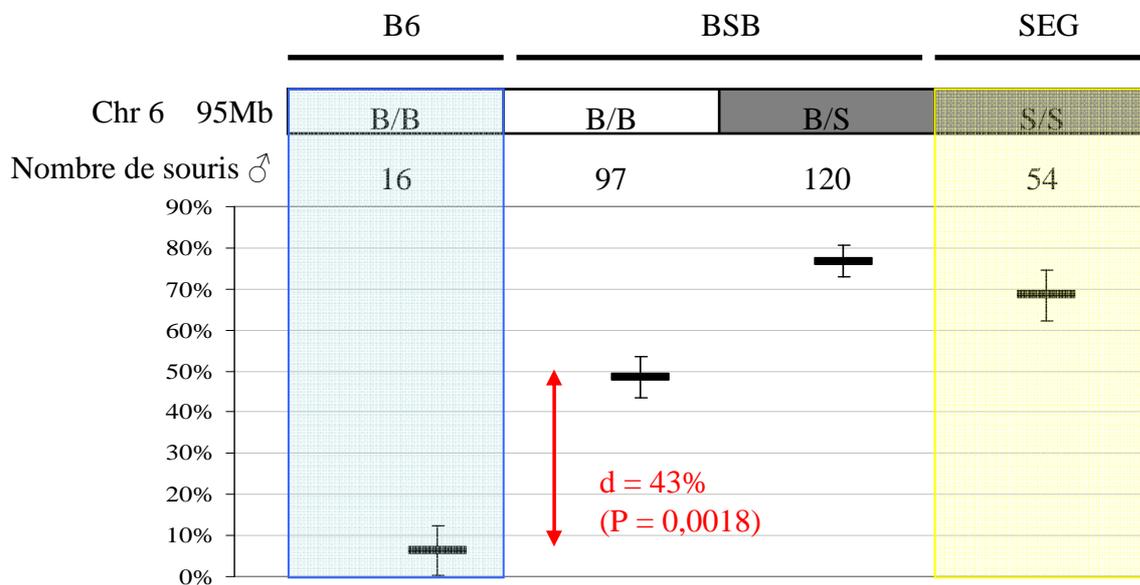
L'analyse de ce croisement avec R/qtl n'a mis en évidence qu'un seul QTL potentiel sur le chromosome 10, avec un LOD total ( $p.\mu$ ) égal à 3,07 (seuil 5% = 3,2). Ce QTL pourrait agir principalement sur le taux de survie ( $LOD_p = 2,08$ ) et non sur la latence ( $LOD_\mu = 0,99$ ) (figure 18). Ce QTL a un effet transgressif sur le phénotype observé, c'est-à-dire que les animaux S/S ont un taux de survie significativement inférieur aux animaux B/S au point culminant du QTL ( $p=0,0032$ , figure 19).

### 3.6. Analyse de la lignée consanguine partielle BcG6

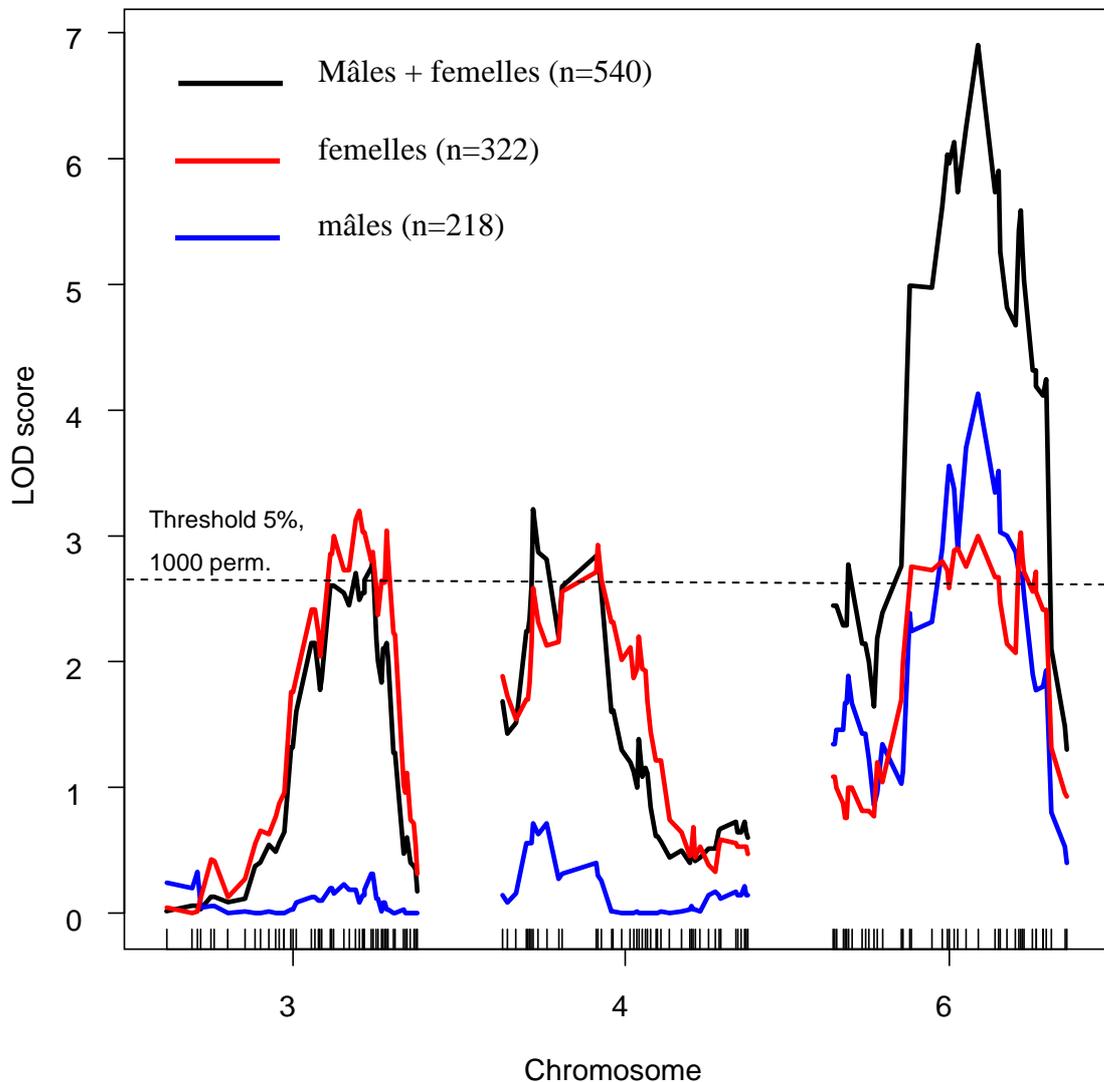
Le locus *Yprl3* est le QTL associé au LOD score le plus élevé et le seul retrouvé dans les deux sexes. Pour tester son effet indépendamment de la présence d'autres QTL, nous avons tiré



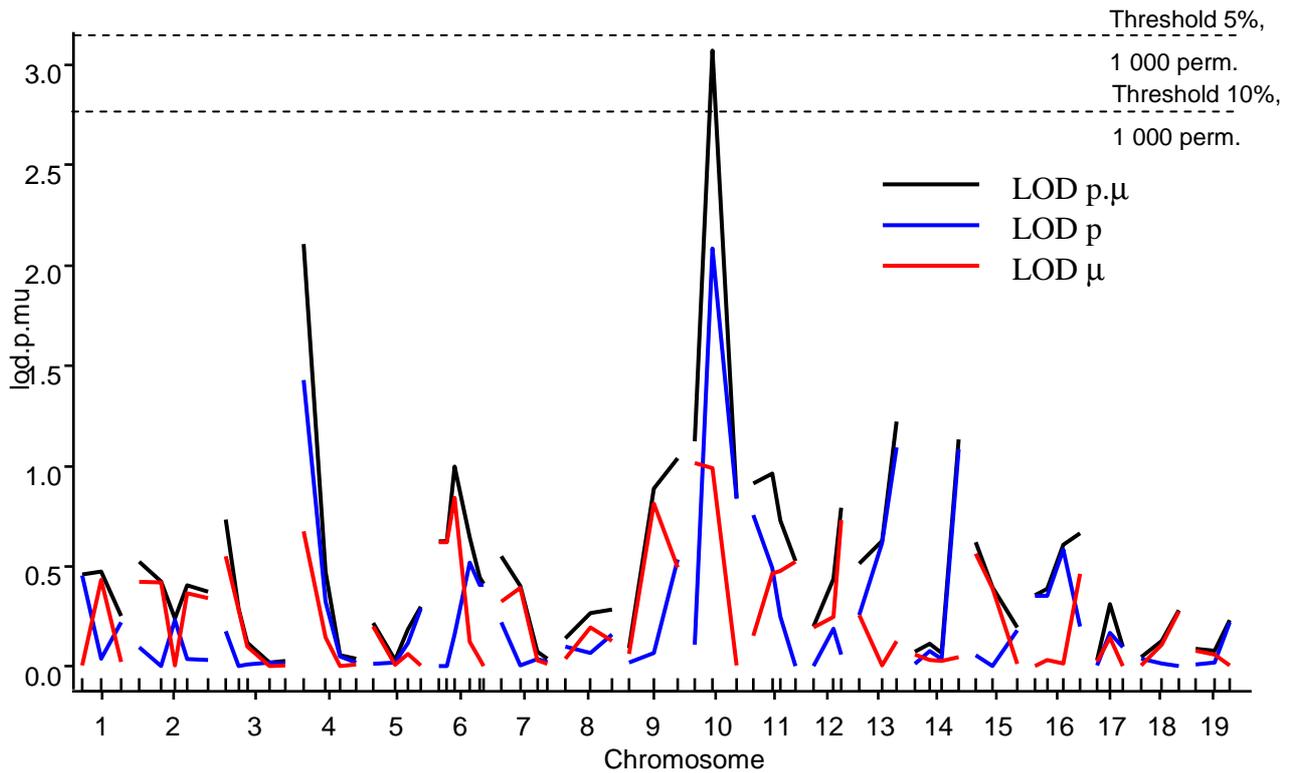
**Figure 15 : Intervalle de confiance du QTL identifié chez les mâles sur le chromosome 6.** La ligne rouge correspond au point culminant du QTL. Les lignes bleues correspondent aux bornes inférieure et supérieure de l'intervalle. Les positions en Mb sont indiquées pour chacune des bornes et des points culminants des QTL.



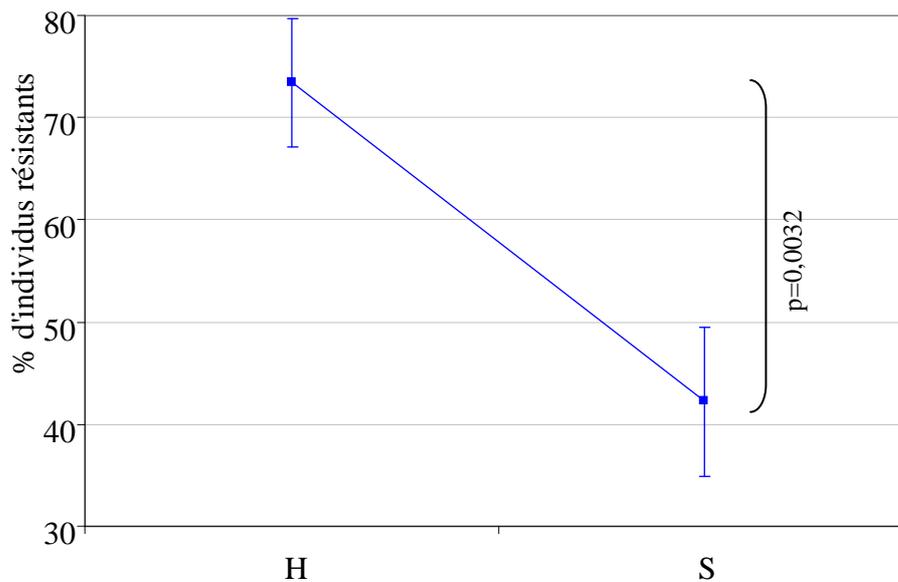
**Figure 16 : Effet du QTL du chromosome 6 chez les mâles sur le taux de survie en fonction du génotype au locus situé au pic du QTL.** La différence entre les individus B/B et B/S au QTL du chromosome 6 est de 38%. Les individus B/S présentent un taux de survie similaire aux souris SEG/Pas. En revanche, celui des souris B/ B est de 43% supérieur à celui des souris B6.



**Figure 17** : Courbes de LOD score établies par cartographie d'intervalle pour le taux de survie (LOD p) pour l'ensemble des animaux (n=540, courbe noire), pour les femelles (n=322, courbe rouge) et pour les mâles (n=218, courbe bleue) pour les chromosome 3, 4 et 6. Le seuil de significativité à 5% a été calculé avec 1000 permutations.



**Figure 18** : Courbes de LOD score établies par cartographie d'intervalle pour le modèle « two-part » (LOD  $p,\mu$ , courbe noire), le taux de survie (LOD  $p$ , courbe bleue) et le jour moyen de mort des individus sensibles (LOD  $\mu$ , courbe rouge) à partir de la population BSS. En abscisse figurent les différents chromosomes avec pour chacun d'entre eux un tiret correspondant à un marqueur microsatellite. Les seuils de significativité ( $p,\mu$ ) à 5 et 10% ont été calculés avec 1000 permutations.



**Figure 19** : Taux de survie en fonction du génotype des souris au marqueur *D10Mit58* dans la population BSS.

partie d'une lignée consomique partielle établie au laboratoire depuis plusieurs années par Marek Szatanik. Elle fait partie d'un projet qui visait à construire une collection de lignées consomiques sur un fonds C57BL/6 portant chacune un, et un seul, chromosome d'origine SEG/Pas (Burgio et al 2007). La plupart de ces lignées se sont éteintes, probablement en raison d'incompatibilités alléliques entre gènes situés sur des chromosomes différents. La lignée BcG6 fait partie des survivantes. Elle porte la plus grande partie du chromosome 6 à l'exception d'un segment centromérique (entre le centromère et 20-25 Mb) et un court segment autour de 125 Mb (figure 20). Elle couvre ainsi la totalité de l'intervalle de confiance de *Yprl3* estimé chez les mâles (73 à 108 Mb) mais le petit intervalle manquant fait partie de l'intervalle de confiance calculé chez les femelles (50 à 137 Mb). Elle est entretenue à l'état homozygote depuis plusieurs générations.

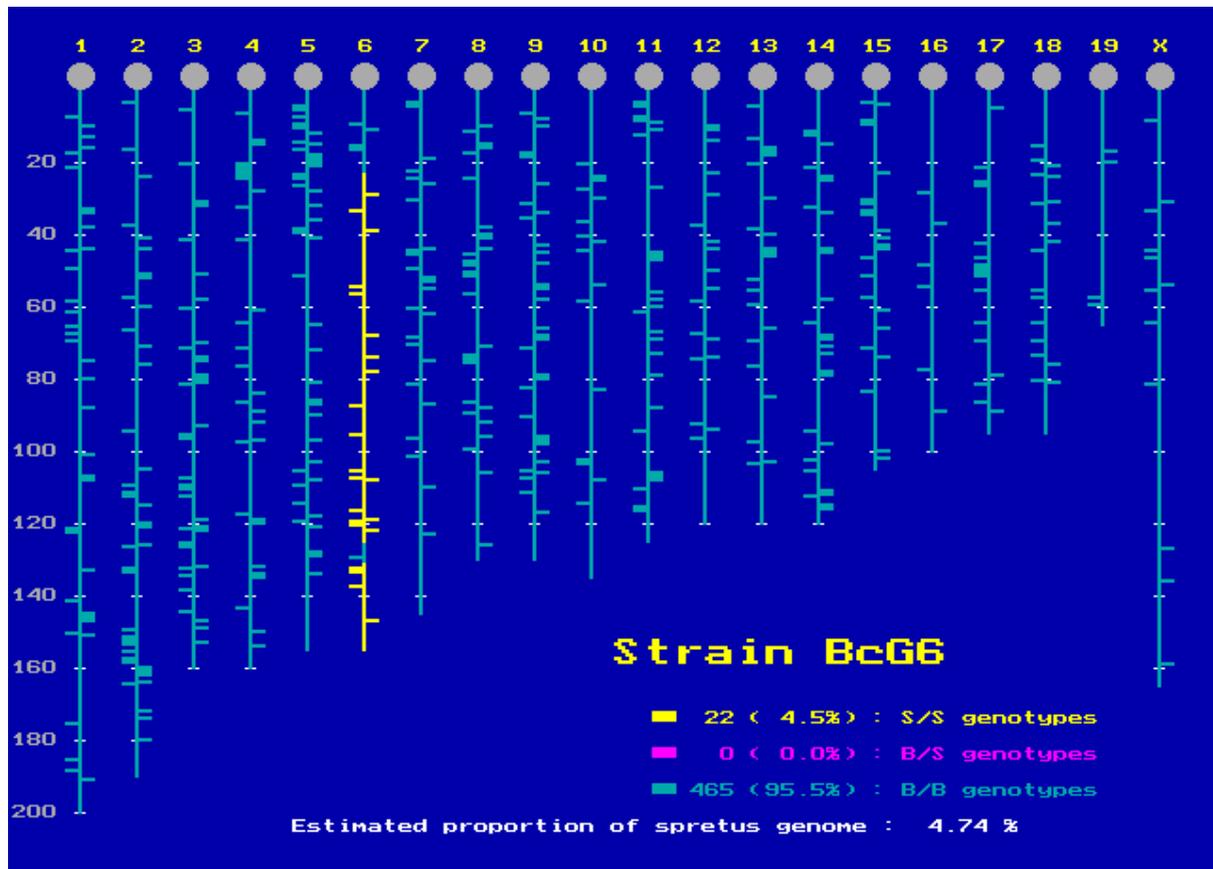
Les résultats du croisement BSB ont montré qu'il existe une différence de survie entre individus B/B et B/S. En revanche, l'absence de QTL sur le chromosome 6 dans le croisement BSS suggérait qu'il n'y avait pas de différence de survie entre individus B/S et S/S, et que l'allèle SEG était dominant. Nous avons donc décidé de comparer la survie de souris C57BL/6 et de souris (C57BL/6J x BcG6)F1, hétérozygotes pour la région consomique. Aucune augmentation significative du taux de survie final n'a été observée entre les deux génotypes, chez les mâles ou chez les femelles. En revanche, nous avons pu identifier un retard de mortalité significatif (une augmentation de la latence). Deux femelles sur 41 (4,9%) ont survécu et les autres sont mortes plus tard que les femelles C57BL/6 ( $p=0,0010$ , figure 21). Aucun des 39 mâles n'a survécu à l'infection mais ils sont morts avec un retard encore plus important par rapport aux femelles C57BL/6 ( $p<0,0001$ ) et même rapport aux femelles (C57BL/6J x BcG6)F1 ( $p=0,025$ , figure 21). Ainsi, alors que *Yprl3* avait été identifié dans le croisement BSB pour son effet sur le taux de survie, le segment du chromosome 6 présent dans la lignée BcG6 agit seulement en retardant la mort des souris sensibles.

### 3.7. Production et analyse de lignées congéniques pour *Yprl1, 2 et 3*

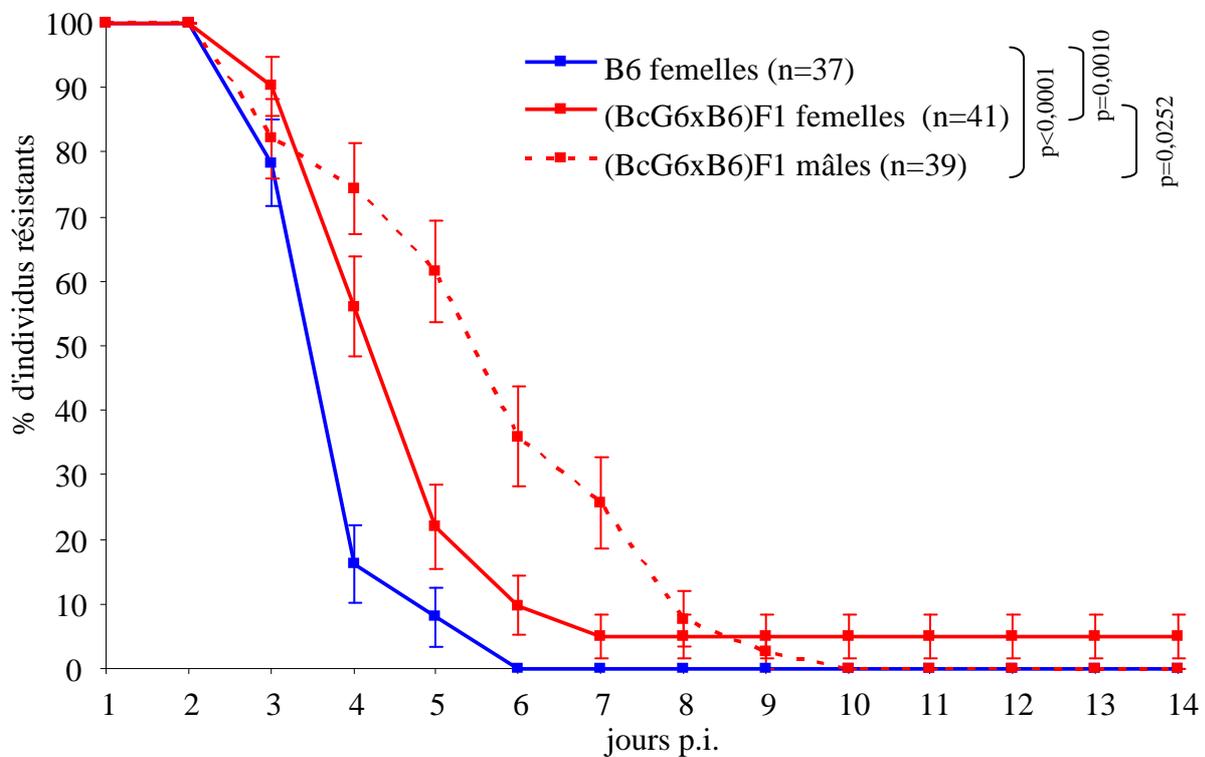
Ne possédant pas de lignées congéniques pour les chromosomes 3 et 4, et considérant que le petit intervalle manquant dans la lignée BcG6 pouvait contenir un QTL important, nous avons produit des lignées congéniques pour les trois chromosomes à partir d'un croisement en retour BSB. Les individus BSB ont été génotypés pour des marqueurs répartis le long des chromosomes, un peu au-delà des bornes estimées des intervalles de confiance (tableau 3). Les souris hétérozygotes pour un ou plusieurs de ces intervalles ont été accouplées avec des souris C57BL/6 pour produire une génération dite N3. Une grande partie des animaux sélectionnés se

**Tableau 3** : Marqueurs microsatellites utilisés pour la géotypage des souris congéniques.

Marqueur	Position (Mb)	Intervalle de confiance QTL
<i>D3Mit169</i>	38	♀
<i>D3Mit242</i>	79	♀
<i>D3Mit107</i>	114	♀
<i>D3Mit14</i>	131	♀
<i>D3Mit197</i>	144	♀
<i>D4Mit260</i>	19	♀
<i>D4Mit93</i>	34	♀
<i>D4Mit89</i>	46	♀
<i>D4Mit114</i>	79	♀
<i>D6Mit346</i>	20	♀
<i>D6Mit222</i>	39	♀
<i>D6Mit194</i>	53	♀
<i>D6Mit8</i>	84	♀+♂
<i>D6Mit383</i>	114	♀
<i>D6Mit254</i>	125 ( <i>Tnfrsf1a</i> )	♀
<i>D6Mit194</i>	128	♀
<i>D6Mit293</i>	142	♀



**Figure 20:** Carte représentant la composition génétique de la lignée BcG6. En jaune sont représentés les régions chromosomiques d'origine SEG/Pas et en bleu celles d'origine C57BL/6J.



**Figure 21:** Courbe de survie des individus (BcG6 x B6)F1 (courbe rouge) par rapport à B6 (courbe bleue). Les femelles sont représentées par une courbe en trait plein alors que les mâles sont représentés par une courbe en pointillés. Les courbes de survie ont été comparées par un test de Mantel-Cox.

sont avérés stériles et seuls quelques uns ont permis d'obtenir la génération suivante. Les problèmes de stérilité ont peu à peu diminué et à partir de la quatrième génération, tous les individus mis en accouplement avaient une reproduction normale.

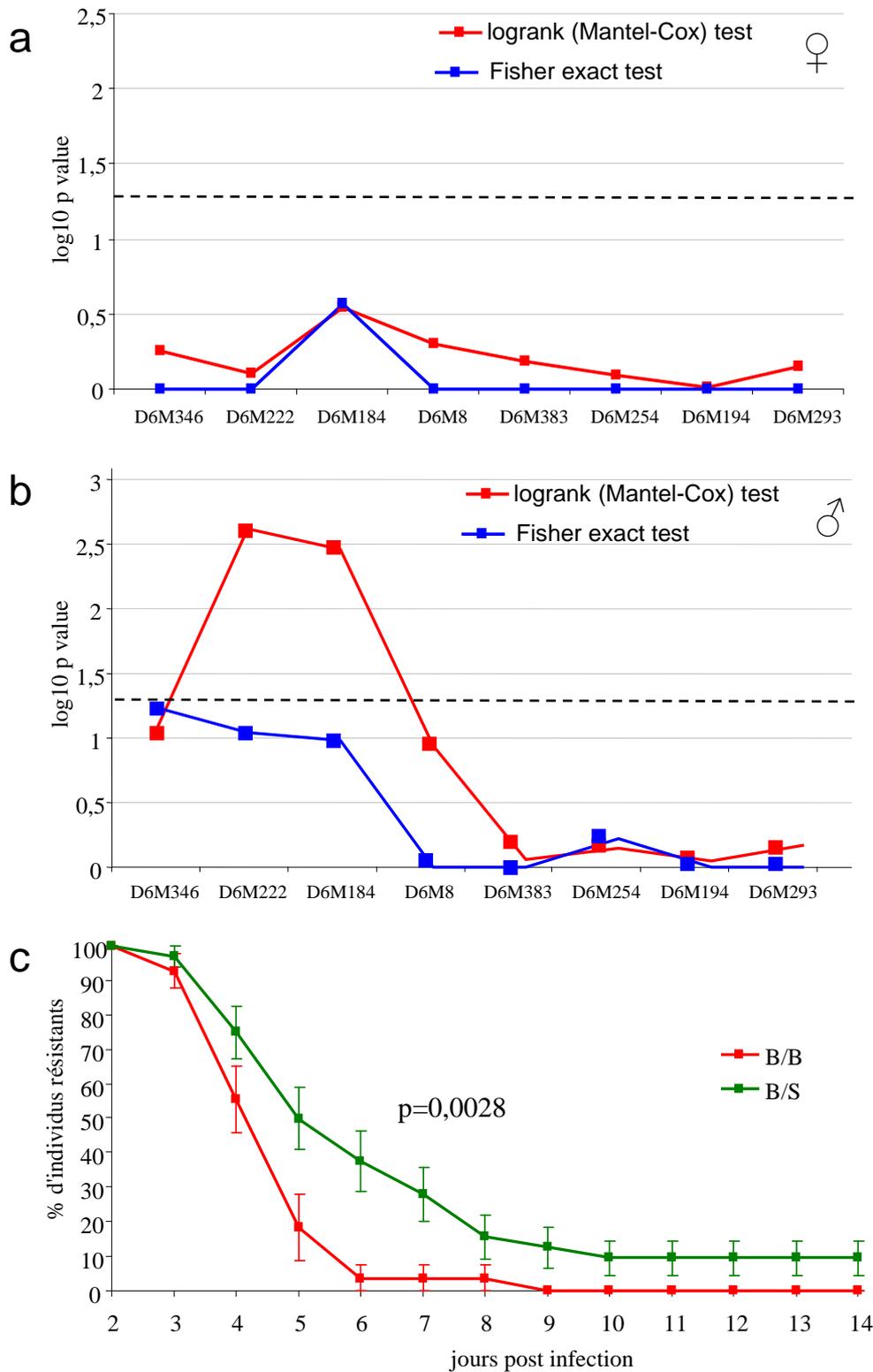
A la 5<sup>ème</sup> génération, les animaux avaient conservé environ  $(1/2)^5 = 1/32$  de génome SEG/Pas, y compris la ou les régions sélectionnées. En ce qui concerne le chromosome 6, nous avons veillé à ne pas perdre la région absente de la lignée BcG6, en utilisant le marqueur microsatellite D6Mit254 situé dans un intron du gène *Tnfrsf1a*.

Nous avons pu produire une grande quantité de souris N5 pour le chromosome 6 afin de confirmer les résultats obtenus sur la lignée BcG6. Cent vingt souris ont été produites en croisant des souris N4 hétérozygotes avec des souris C57BL/6. Elles ont été génotypées pour connaître l'étendue de la région du chromosome 6 portée par chacune, c'est-à-dire leur haplotype. Elles ont toutes été infectées selon notre protocole standard afin que les souris homozygotes B/B pour un marqueur puissent servir de témoin pour les souris hétérozygotes B/S pour ce même marqueur. Il était ainsi possible de tenir compte de l'éventuel effet des quelques régions SEG qui n'avaient pas encore été éliminées par les croisements en retour successifs.

Comme nous n'avions pas à notre disposition suffisamment de souris possédant l'intégralité de la région du chromosome 6 sélectionnée, nous avons effectué une comparaison locus par locus (Logrank Mantel-Cox pour les courbes de survie, test exact de Fischer pour la proportion d'individus résistants). Nous avons analysé séparément les mâles et les femelles compte tenu des différences entre sexes observées précédemment.

L'analyse des 61 femelles n'a montré aucun effet quel que soit le marqueur et que ce soit sur le taux de survie ou sur la latence (figure 22a). En revanche, l'analyse des 59 mâles a mis en évidence un allongement significatif de la survie de souris hétérozygotes pour 2 marqueurs proximaux (*D6Mit222*,  $p = 0,0028$ , figure 22b et c). Le taux de survie était augmenté pour les trois marqueurs les plus proximaux, sans toutefois atteindre le seuil de 5% ( $p = 0,062$  pour *D6Mit346*).

Ces résultats ont permis de confirmer en partie les données obtenues à partir des animaux (C57BL/6J x BcG6)F1, et d'affiner la localisation du QTL du chromosome 6 (*Yprl3*). L'absence d'effet chez les femelles est inattendue et il sera nécessaire d'analyser davantage d'animaux, et en particulier de disposer de groupes suffisants d'animaux hétérozygotes pour la même région afin de pouvoir conclure définitivement. De même, nous n'avons pas disposé jusqu'à présent de



**Figure 22: Analyse du phénotype des souris congéniques B.S-chr6 (N5).**

(a) et (b) Pour chacun des marqueurs microsatellites utilisés pour le génotypage des animaux, le phénotype des individus a été comparé en fonction du génotype par un test de Mantel-Cox (comparaison courbes de survie, courbe rouge) et un test exact de Fisher (comparaison du nombre d'individus résistants à la fin de la période d'observation, courbe bleue). Les valeurs de p ont subi une transformation log10. Les femelles (a) et les mâles (b) ont été analysés séparément.

(c) Courbe de survie des mâles B.S-chr6 au marqueur *D6Mit222* (chr6, 39 Mb) en fonction du génotype. Les individus hétérozygotes à ce locus meurent significativement plus tardivement que les individus homozygotes B6.

suffisamment d'animaux pour les chromosomes 3 et 4 pour pouvoir faire la même analyse. Enfin, il sera nécessaire de produire des individus portant deux ou les trois régions chromosomiques à la fois afin de confirmer ou non l'effet combiné de ces régions.

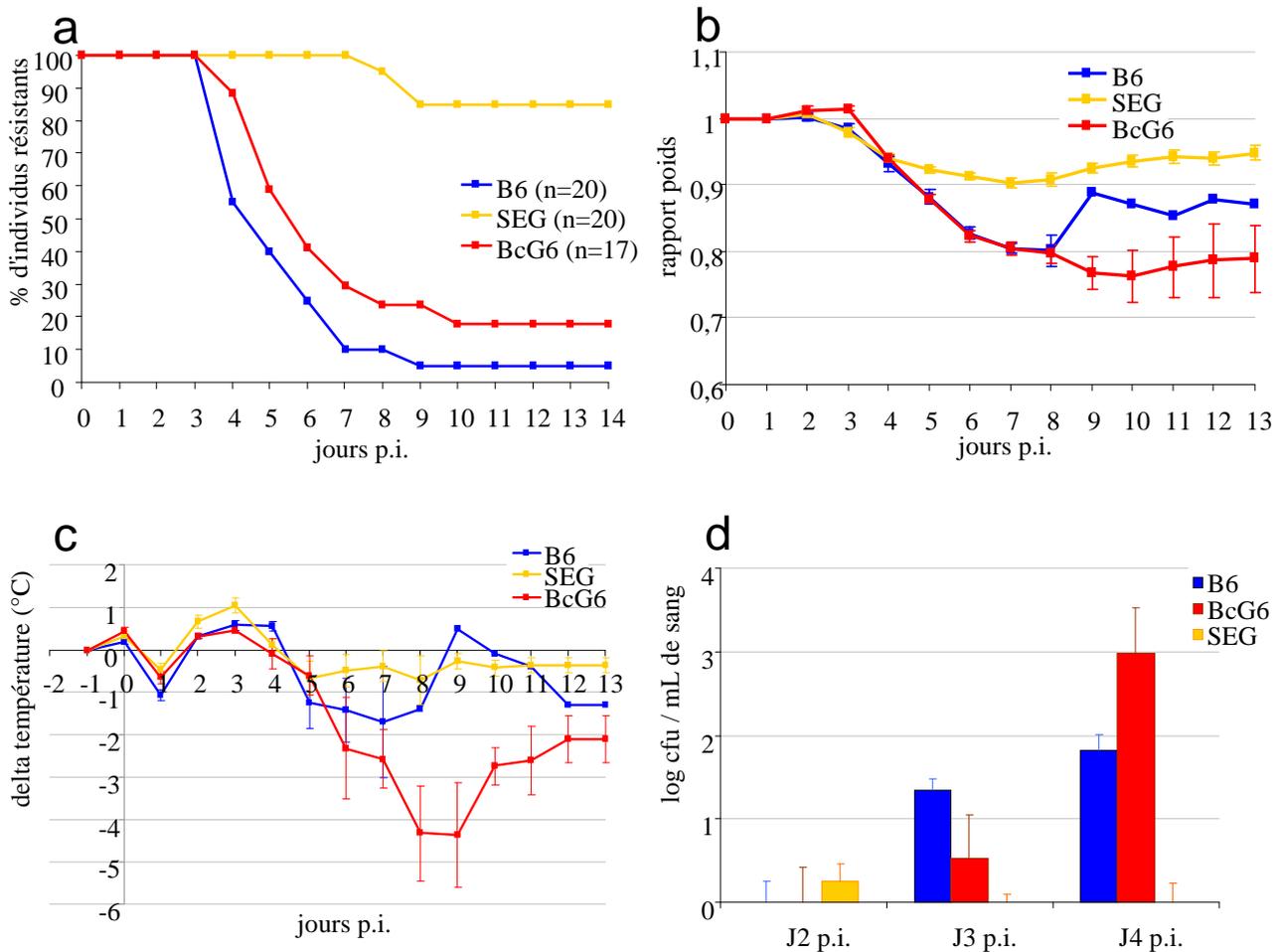
### 3.8. Recherche de sous-phénotypes pour quantifier le degré de résistance

Le seul phénotype utilisé jusqu'ici est la capacité des animaux à survivre à l'inoculation expérimentale de la bactérie, dans des conditions aussi standardisées que possible. Chaque individu fournit une réponse binaire (mort/survie) et les individus sensibles fournissent également une donnée quantitative (le nombre de jours séparant l'infection de la mort). Cette évaluation de la résistance reste très approximative. De plus, elle repose sur l'issue finale de la maladie, qui résulte probablement de défaillances organiques multiples. Il est évident que le mode d'action des gènes responsables de la résistance des souris SEG/Pas se situe très en amont de la mort des souris qui n'en traduit que les conséquences très indirectes.

Nous avons donc cherché à définir d'autres paramètres capables de quantifier la réponse de chaque souris, y compris parmi celles qui finalement résistent à l'infection. Nous avons retenu dans un premier temps le poids corporel, la température et la bactériémie. Les deux premières mesures, non invasives, peuvent être répétées chaque jour sans dommage pour l'animal. La mesure de la bactériémie nécessite en revanche de prélever un échantillon de sang pour cultiver la bactérie et ne peut pas être effectuée chaque jour tout au long de l'infection. Des données préliminaires nous ont conduits à décider de faire cette mesure les 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jours après l'infection. Afin de limiter l'effet des fluctuations inter individuelles, ce sont les mêmes souris qui ont servi pour tous les points de mesure.

Trois groupes ont été comparés : 20 femelles SEG/Pas, 20 femelles C57BL/6J et 17 souris BcG6 (7 femelles et 10 mâles pour des raisons de disponibilité). Une sonde permettant la télémessure de la température a été implantée par voie sous-cutanée en région interscapulaire dans chaque souris, deux semaines avant l'infection de façon à ce qu'une éventuelle réaction inflammatoire liée à l'implantation ait le temps de se résoudre.

Les résultats sont présentés figure 23. Les taux de survie observés pour C57BL/6 et SEG étaient similaires avec ceux des expériences précédentes (respectivement 5% et 85%). Celui du groupe BcG6 était supérieur à celui de C57BL/6 (17%), mais pas significativement ( $p = 0,31$ ). Ces données ont permis de valider le bon déroulement de l'infection.



**Figure 23 : Suivi de différents paramètres au cours de l'infection chez les souris SEG/Pas, B6 et BcG6.** (a) Courbe de survie des animaux. (b) Suivi du rapport du poids des souris (poids au jour p.i. indiqué rapporté au poids de départ) au cours de l'infection. (c) Suivi de la température corporelle (température au jour p.i. indiqué moins la température avant infection) au cours de l'infection. (d) Cinétique de la bactériémie chez les souris B6, SEG/Pas et BcG6 au cours de l'infection. L'histogramme représente la médiane.

Le poids mesuré la veille de l'infection a servi de point de référence. Au cours des trois premiers jours, le poids est resté à son niveau initial dans les trois groupes. Le 4<sup>ème</sup> jour, il a diminué en moyenne de 7% dans les trois groupes. Les différences entre groupes sont apparues à partir du 5<sup>ème</sup> jour. La perte de poids moyenne des souris SEG/Pas n'a jamais dépassé 10%, alors que celle des souris BcG6 et C57BL/6 est allée jusqu'à 20%, voire même 24% pour les trois souris BcG6 survivantes. On note qu'il existe un petit décalage entre les courbes de survie des souris C57BL/6 et BcG6 alors que leurs courbes de poids sont strictement superposées jusqu'à 8 jours après infection.

La température corporelle a également été rapportée à la valeur mesurée pour chaque animal la veille de l'infection. Après une phase d'hyperthermie modérée entre les jours 2 et 4 dans les trois groupes, la température des souris SEG/Pas s'est stabilisée autour de la valeur initiale. En revanche, celle de souris C57BL/6 et BcG6 a diminué au fur et à mesure que les animaux approchaient de la phase terminale, durant laquelle la température corporelle était de 3 à 5 °C inférieure à la température initiale.

Les souris SEG/Pas ont développé un petit pic de bactériémie le 2<sup>ème</sup> jour, qui a disparu les jours suivants. A l'inverse, chez les souris C57BL/6 et BcG6 la bactériémie n'est apparue qu'au 3<sup>ème</sup> jour mais a augmenté fortement au 4<sup>ème</sup> jour.

En conclusion, les mesures quantitatives effectuées sur les souris des trois groupes sont bien corrélées avec le phénotype de résistance ou de vulnérabilité. La différence est très claire entre SEG/Pas et les deux autres lignées. En revanche, aucune différence notable n'a été observée entre C57BL/6 et BcG6, qui aurait pu indiquer un effet du chromosome 6.

### 3.9. Etude du gène candidat *Tnfrsf1a*

Si le locus *Yprl3* identifié chez les femelles BSB est le même que le locus identifié chez les mâles, il doit se trouver dans l'intersection des intervalles de confiance calculés pour chaque sexe. Néanmoins, les bornes d'un intervalle de confiance ne sont pas connues avec précision mais sur la base d'un risque consenti et on ne peut pas se fier à ces bornes pour exclure une région de façon catégorique. Notre attention a été attirée par le court segment délété dans la lignée BcG6, autour de la position 125Mb. Nous avons formulé l'hypothèse qu'il pourrait y avoir, dans la région couverte par la lignée BcG6, un premier gène responsable du retard de mortalité observé chez les (C57BL/6J x BcG6)F1. Un deuxième gène, capable d'augmenter le taux de survie et responsable de l'effet de *Yprl3* observé dans le croisement BSB, pourrait se trouver dans le court

intervalle manquant. Nous avons alors génotypé des individus BcG6 pour des marqueurs microsatellites et montré que le segment C57BL/6 se situe entre les positions 124 et 128 Mb.

Cette région contient le gène *Tnfrsf1a* aussi appelé TNF récepteur p55, décrit pour être le principal récepteur du TNF $\alpha$  et pour jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire. Les souris déficientes pour ce récepteur sont extrêmement résistantes à l'injection d'une dose létale de TNF. Elles sont aussi protégées contre une injection de LPS couplé à la galactosamine (GalN), ce qui a permis de mettre en évidence que le mécanisme mis en place dans un modèle d'hépatite était dépendant du TNF (Pfeffer *et al.*, 1993). L'absence de ces récepteurs diminue l'immunocompétence des souris. Divers travaux ont montré que des souris p55 KO sont extrêmement sensibles à une infection par *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* et *Salmonella typhimurium* (Pfeffer *et al.*, 1993; Pfeffer, 2003; Rothe *et al.*, 1993). En revanche, les travaux de Secher et coll. ont mis en évidence le rôle des récepteurs du TNF dans la dérégulation des réponses immunes et la mort associées au choc septique dans un modèle d'infection. En effet, les souris déficientes pour les deux récepteurs du TNF résistent à une infection polybactérienne contrairement aux souris C57BL/6 (Secher *et al.*, 2009).

Compte tenu des rôles du gène TNF et de ses récepteurs dans différentes infections bactériennes, il nous a semblé intéressant de tester l'effet d'une mutation dans le gène p55 sur la sensibilité à *Y. pestis*.

### 3.9.1. Recherche de mutation dans la séquence de *Tnfrsf1a*

Le gène *Tnfrsf1a* se situe sur le chromosome 6 entre les positions 125.299.380 et 125.312.502 pb. Il code pour une protéine de 454 acides aminés qui comporte trois domaines : un domaine extracellulaire permet tant la reconnaissance de son ligand et qui est très riche en cystéines (appelé CRD1-4), un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire. Ce domaine intracellulaire comporte deux régions fonctionnelles : un domaine proche de la membrane et le domaine C-terminal appelé "*death domain*" (DD). Le premier induit l'activation de la sphingomyélinase en recrutant la protéine adaptatrice FAN (Adam-Klages *et al.*, 1998). Le DD interagit avec la protéine adaptatrice TRADD. Cette dernière recrute d'autres protéines et initie un signal d'activation. TRADD est impliqué dans l'activation des caspases, de la voie de signalisation des phospholipases et de protéines kinases telles que NF- $\kappa$ B et MAP kinase (Hsu *et al.*, 1996).

Nous avons séquencé les 2186 pb de l'ADNc du gène *Tnfrsf1a* de C57BL/6 et de SEG/Pas et identifié 15 SNP parmi lesquels 8 induisent un changement d'acides aminés, 2 dans la partie extracellulaire, 4 dans la partie transmembranaire et 2 dans le DD.

Afin d'identifier lequel de ces SNP pouvait contribuer à la différence de sensibilité entre les deux lignées, nous avons analysé la lignée STF/Pas, une autre lignée *Mus spretus* élevée à l'Institut Pasteur. Contrairement à SEG/Pas, STF/Pas est aussi sensible à l'infection par *Y. pestis* que C57BL/6. Nous avons donc recherché, parmi les SNP précédemment identifiés, ceux pour lesquels STF/Pas possédait le même allèle que C57BL/6. Seules deux mutations, qui modifient les acides aminés 394 et 431 à l'intérieur du DD répondaient à ce critère (figure 24a). Nous avons ensuite montré que les lignées SEB, SMZ (résistantes) et SFM (intermédiaires) possédaient aussi un allèle de type SEG/Pas, ce qui confortait l'observation précédente (figure 24b).

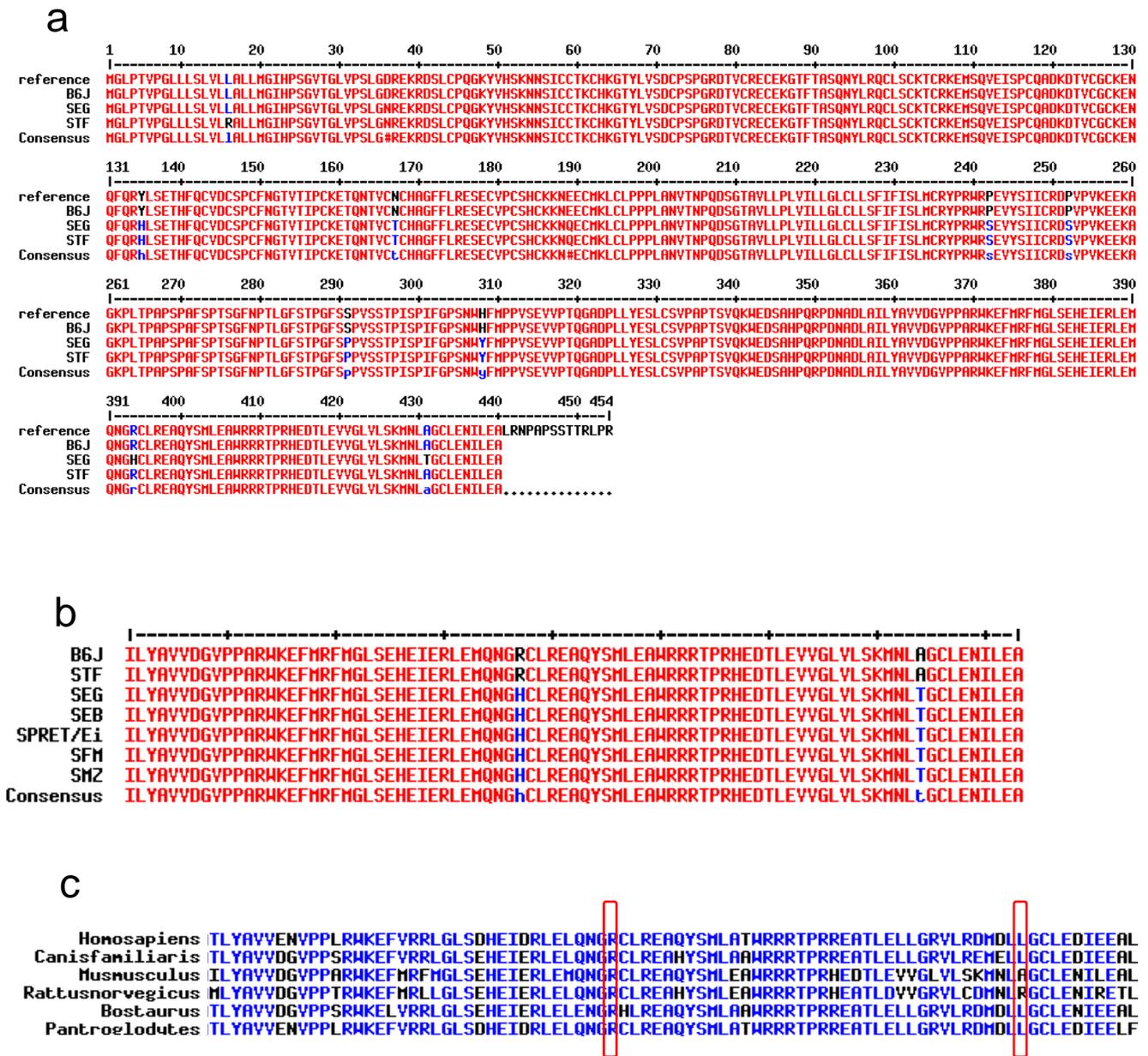
Par comparaison de séquence entre espèce (homme, chimpanzé, chien, rat, bovin), nous avons trouvé qu'en position 394, toutes les espèces étudiées, possèdent une arginine comme C57BL/6 et STF/Pas. L'acide aminé en position 431 est moins conservé puisque C57BL/6 et STF/Pas possèdent une alanine, SEG/Pas et les autres lignées *spretus* résistantes une thréonine, le rat une arginine et les autres espèces analysées une leucine (figure 24c). La position 394 semble donc davantage conservée à travers les espèces.

### 3.9.2. Analyse du phénotype des souris *Tnfrsf1a*<sup>-/-</sup>

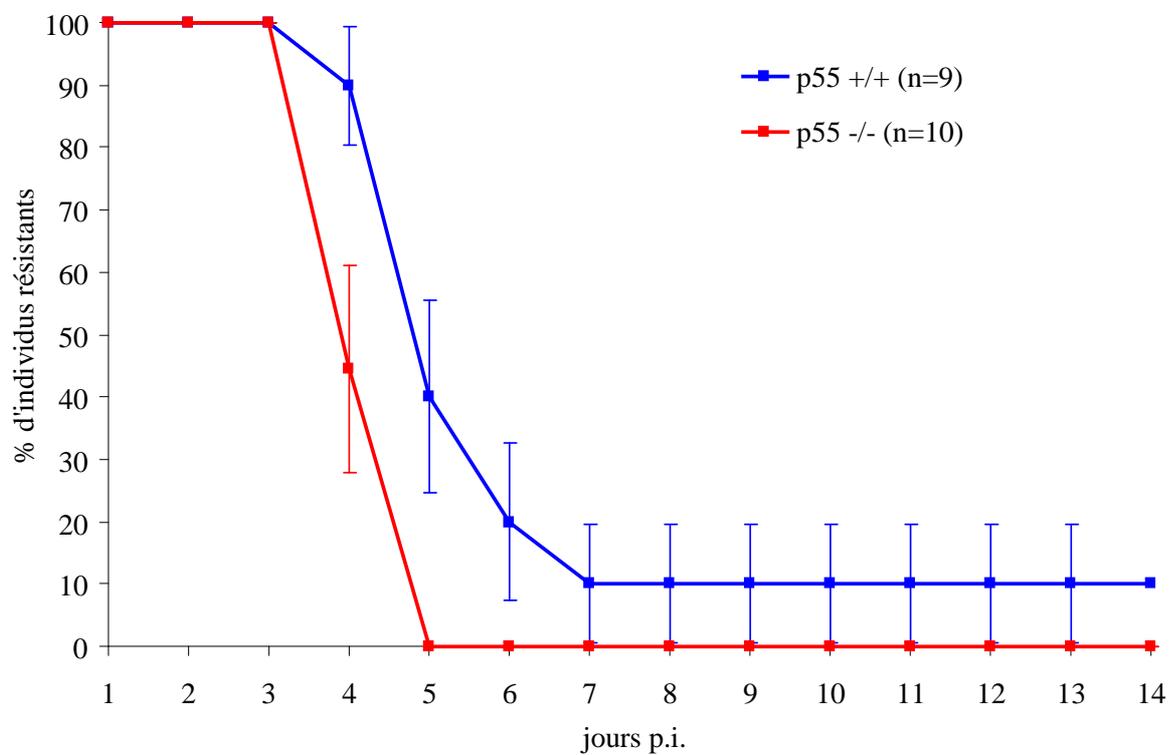
Pour évaluer la conséquence éventuelle d'une modification du niveau d'activité du gène *Tnfrsf1a* sur la sensibilité à *Y. pestis*, nous avons évalué la sensibilité de souris dans lesquelles ce gène a été inactivé par recombinaison homologe (appelées p55<sup>-/-</sup>). Ces souris nous ont été fournies par Claude Libert (Université de Gand). Neuf femelles p55<sup>-/-</sup> (sur fonds C57BL/6) et 10 femelles C57BL/6 (p55<sup>+/+</sup>) ont été infectées avec 100 ufc de *Y. pestis* par voie sous cutanée. Les souris déficientes pour le gène *Tnfrsf1a* ont présenté une sensibilité un peu plus élevée que les souris C57BL/6, en mourant significativement plus tôt (Logrank p=0,0098, figure 25).

### 3.9.3. Analyse fonctionnelle *in vitro* des deux mutations du DD

Nous avons cherché à mettre en évidence une éventuelle modification fonctionnelle associée aux deux changements d'acides aminés identifiés lors de la comparaison de la séquence du gène *Tnfrsf1a* entre lignées de souris sensibles et résistantes à *Y. pestis*. Pour cela, nous avons évalué l'activation de la voie du récepteur au TNF *in vitro*, dans des macrophages péritonéaux.



**Figure 24 : Alignement des séquences d'acides aminés du gène *Tnfrsfla*.** (a) Alignement des acides aminés de la protéine complète pour les lignées B6, SEG et STF. Les acides aminés sont notés en rouge lorsqu'il n'y a pas de différence et en bleu dans le cas opposé. (b) Alignement des acides aminés du Death Domain de la protéine TNFRSF1A pour l'ensemble des lignées *Mus spretus* testées. (c) Alignement des acides aminés du Death Domain de la protéine TNFRSFA pour plusieurs espèces de mammifères. Les mutations R394H et A431T sont repérées par un cadre rouge.



**Figure 25 : Courbe de survie des souris p55<sup>-/-</sup> après une injection de 100 ufc de *Y. pestis* par voie sous cutanée. Les souris p55<sup>-/-</sup> meurent significativement plus rapidement que les souris p55<sup>+/+</sup> (p=0,0098, test de Mantel-Cox).**

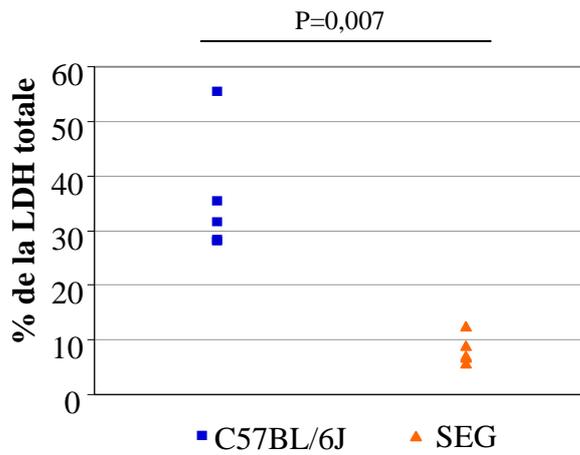
Les macrophages, par leur capacité à phagocyter des bactéries et à induire une réponse inflammatoire, jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée. *Y. pestis* possède un ensemble de toxines (Yop, cf paragraphe 1.4.2.) qui, une fois injectées dans le cytosol des macrophages par le complexe T3SS, inhibe des signaux de transduction et induit la mort cellulaire (Zhang & Bliska, 2005). L'étude de la fonctionnalité des macrophages *in vitro* permet ainsi d'évaluer une phase importante des interactions entre la bactérie et son hôte.

Dans un premier temps, nous avons testé, en collaboration avec Christian Demeure de l'Unité des Yersinia, la sensibilité de macrophages infectés *in vitro* par *Y. pestis*. Des macrophages péritonéaux de 4 souris SEG et 4 souris C57BL/6J ont été collectés par lavage, poolés dans chaque groupe et exposés, après adhérence, pendant 5h à la souche CO92 de *Y. pestis*, à raison de 10 ufc de bactéries par cellule. La mort cellulaire a été mesurée par le pourcentage de LDH libérée dans le surnageant par rapport au contenu total du puits. Les macrophages d'origine SEG/Pas ont montré significativement moins de mort cellulaire que les macrophages de C57BL/6J ( $p=0,0007$ ) (figure 26). Ce résultat montre que le phénotype de résistance au niveau de l'organisme entier est reflété par la résistance des macrophages *in vitro*.

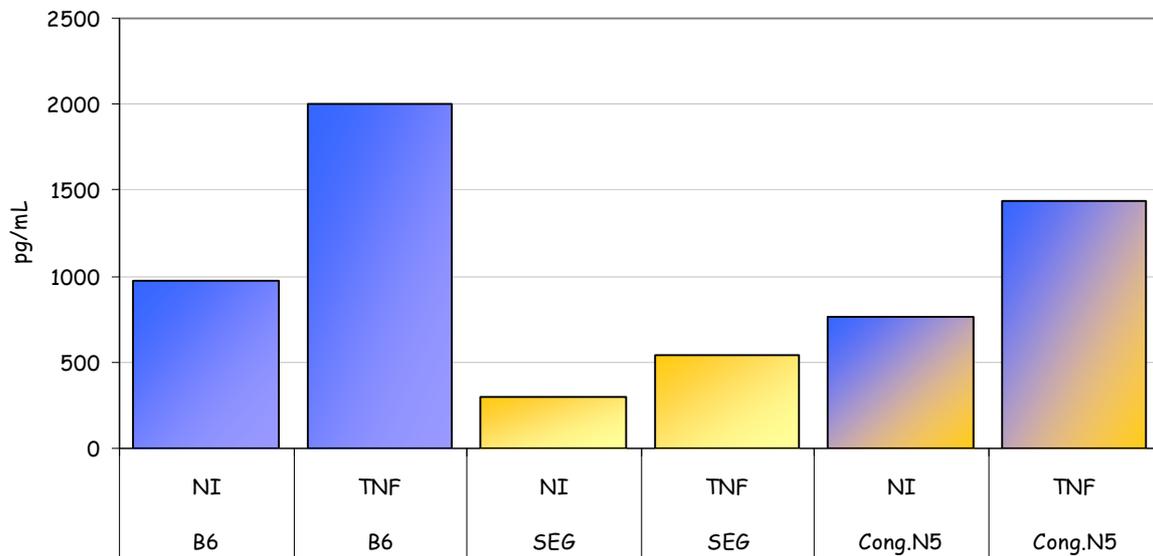
Nous avons ensuite testé l'effet des mutations R394H et A431T en analysant les macrophages de souris SEG/Pas, C57BL/6 et de souris congéniques (N5) possédant l'allèle SEG de *Tnfrsf1a* sur un fonds presque totalement C57BL/6. Les macrophages péritonéaux ont été stimulés ou non pendant 4h par 10 ng/ml de TNF $\alpha$  qui est le ligand spécifique du récepteur p55 (*Tnfrsf1a*). Un dosage par ELISA de l'IL-6 a été réalisé sur les surnageants des macrophages non stimulés, pour évaluer le niveau d'activation initial, et stimulés par le TNF $\alpha$ , pour vérifier l'efficacité de l'activation.

Les taux d'IL-6 mesurés sur les macrophages non stimulés ont présenté des variations importantes entre lignées : 250 pg/mL pour SEG/Pas, 700 pg/mL pour les congéniques et 1000 pg/mL pour les souris C57BL/6, traduisant déjà un niveau basal élevé. Toutefois, le rapport entre les taux d'IL-6 en présence et absence de stimulation par le TNF $\alpha$  est proche : 1,84 pour les SEG/Pas, 1,87 pour les congéniques et 2,07 pour les C57BL/6 (figure 27).

Les ARNm des macrophages ont été extraits et analysés par qRT-PCR pour mesurer le niveau d'expression, en réponse à l'activation par le TNF $\alpha$ , de gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose, la réponse inflammatoire, la voie NF- $\kappa$ B, la voie JNK, etc... (cf. tableau 2)



**Figure 26 : Mort cellulaire des macrophages péritonéaux de SEG et B6 induits par une infection *in vitro* par *Y. pestis* CO92 (10 bactéries/cellule). La mort cellulaire est quantifiée par le pourcentage de LDH libre par rapport au contenu total du puits.**



**Figure 27 : Taux d'IL6 mesuré dans les surnageants de culture des macrophages péritonéaux de B6, congénique et SEG, avant (NI) et après (TNF) induction par TNF $\alpha$ .**

**Tableau 2 :** Listes des gènes dont l'expression a été quantifiée par qRT-PCR dans des macrophages péritonéaux stimulés (notés TNF) ou non par du TNF $\alpha$  (notés NI pour non induits) dans les différentes lignées de souris étudiées ainsi que les quantifications obtenues.

Refseq	Symbol	Description	Fold change B6 TNF/Non induit	Fold change SEG TNF/Non induit
NM_009684	<i>Apaf1</i>	Apoptotic peptidase activating factor 1	11,3135676	0,43226876
NM_007486	<i>Arhgdib</i>	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	0,97265495	0,72698627
NM_026121	<i>Bag4</i>	BCL2-associated athanogene 4	2,42829752	0,48296269
NM_009741	<i>Bcl2</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2	2,17336377	0,45061307
NM_007544	<i>Bid</i>	BH3 interacting domain death agonist	1,98618999	0,99308944
NM_023525	<i>Cad</i>	Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	2,71321897	0,64617789
NM_007610	<i>Casp2</i>	Caspase 2	0,75785681	0,92659208
NM_009810	<i>Casp3</i>	Caspase 3	2,47945386	0,6285063
NM_009812	<i>Casp8</i>	Caspase 8	0,84673917	0,85856766
NM_011611	<i>Cd40</i>	CD40 antigen	1,69349254	2,09943731
NM_011616	<i>Cd40lg</i>	CD40 ligand	1,18104826	1,70514671
NM_009805	<i>Cflar</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	6,10502268	1,03526538
NM_007700	<i>Chuk</i>	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	0,72698507	0,93950747
NM_009950	<i>Cradd</i>	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	0,7955916	1,70514671
NM_007808	<i>Cyts</i>	Cytochrome c, somatic	1,18099273	1,06437018
NM_010044	<i>Dffa</i>	DNA fragmentation factor, alpha subunit	4,00009241	0,58236535
NM_013642	<i>Duspl</i>	Dual specificity phosphatase 1	1,9861848	0,92018758
NM_175540	<i>Eda2r</i>	Ectodysplasin A2 isoform receptor	0,63294982	1,70514671
NM_010175	<i>Fadd</i>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	0,75786037	1,43393921
NM_007987	<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	1,31950731	0,93952566
NM_010177	<i>Fasl</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	0,63294982	1,70514671
NM_010546	<i>Ikkkb</i>	Inhibitor of kappaB kinase beta	4,05581942	0,8705993
NM_010547	<i>Ikkkg</i>	Inhibitor of kappaB kinase gamma	5,20533672	0,62851027
NM_010591	<i>Jun</i>	Jun oncogene	2,75108534	0,56252922
NM_019390	<i>Lmna</i>	Lamin A	2,14354905	0,73204303
NM_010721	<i>Lmnb1</i>	Lamin B1	5,35170639	0,57435059
NM_010722	<i>Lmnb2</i>	Lamin B2	8,33981865	0,85263196
NM_010735	<i>Lta</i>	Lymphotoxin A	0,77388942	1,70514671
NM_008518	<i>Ltb</i>	Lymphotoxin B	3,24902194	1,07177313
NM_010736	<i>Ltbr</i>	Lymphotoxin B receptor	1,5052437	1,04246574
NM_009157	<i>Map2k4</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	2,94854411	1,00698209
NM_011945	<i>Map3k1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	1,53687747	0,66890942
NM_016896	<i>Map3k14</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	6,27651893	0,70222857
NM_172688	<i>Map3k7</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	2,8284233	1,70514671
NM_016700	<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	6,02098025	0,64171301
NM_008689	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	1,59107339	1,47426905
NM_010907	<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2,80888976	1,46408583
NM_033217	<i>Ngfr</i>	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	0,63294982	1,70514671
NM_011035	<i>Pak1</i>	P21 (CDKN1A)-activated kinase 1	0,73713647	0,7846029
NM_177326	<i>Pak2</i>	P21 (CDKN1A)-activated kinase 2	3,75809072	0,70710593
NM_007415	<i>Parp1</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	0,8950226	0,84674796
NM_009402	<i>Pglyrp1</i>	Peptidoglycan recognition protein 1	0,92659022	1,49502822

NM_011159	<i>Prkdc</i>	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide	3,31751358	0,48968264
NM_009029	<i>Rb1</i>	Retinoblastoma 1	1,72908838	0,84674551
NM_001076 554	<i>Spna2</i>	Spectrin alpha 2	2,46229062	0,7791654
NM_011529	<i>Tank</i>	TRAF family member-associated Nf-kappa B activator	1,19747884	1,87904262
NM_013693	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	1,22264174	3,506416
NM_009397	<i>Tnfaip3(A20)</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	6,40856479	1,40444669
NM_020275	<i>Tnfrsf10b(Dr5)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	0,76318313	1,70514671
NM_009399	<i>Tnfrsf11a (rank)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a	1,93189207	1,38509029
NM_008764	<i>Tnfrsf11b (Tr1)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	0,63294982	1,70514671
NM_013749	<i>Tnfrsf12a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	2,62078268	0,56643918
NM_021349	<i>Tnfrsf13b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	3,60503298	1,28349022
NM_028075	<i>Tnfrsf13c (baff-r)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c	0,48967693	1,53704437
NM_178931	<i>Tnfrsf14</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	2,84808411	0,85856344
NM_011608	<i>Tnfrsf17(bcm)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	0,63294982	1,70514671
NM_009400	<i>Tnfrsf18(Gitr)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	1,40444389	1,76546965
NM_013869	<i>Tnfrsf19(Trade)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	0,63294982	1,70514671
NM_177073	<i>Relt</i>	RELT tumor necrosis factor receptor	3,65535361	0,60709924
NM_011609	<i>Tnfrsf1a (p55)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	1,80250222	0,75262152
NM_011610	<i>Tnfrsf1b (p75)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	7,01284715	0,81790123
NM_178589	<i>Tnfrsf21(Dr6)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	2,39495915	0,47631916
NM_033042	<i>Tnfrsf25 (Dr3)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	0,63294982	1,70514671
NM_011659	<i>Tnfrsf4</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	0,82931547	1,71713839
NM_001033 126	<i>Cd27</i>	CD antigen 27	0,63294982	1,70514671
NM_009401	<i>Tnfrsf8 (Cd30)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	8,69421965	1,49481771
NM_011612	<i>Tnfrsf9 (Ly63)</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	3,41055967	1,12506671
NM_009425	<i>Tnfsf10 (Trail)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	1,70533717	1,51569624
NM_011613	<i>Tnfsf11(RankL)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	0,63294982	1,70514671
NM_011614	<i>Tnfsf12(Apo3l)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	0,85856	1,63580417
NM_023517	<i>Tnfsf13(Trdl1)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	2,04201059	0,76312874
NM_033622	<i>Tnfsf13b (Baff)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	0,63294982	0,77912088
NM_019418	<i>Tnfsf14</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	0,72698549	0,80659841
NM_177371	<i>Tnfsf15 (Tll)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	0,63294982	1,70514671
NM_183391	<i>Tnfsf18(Gitrl)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	0,63294982	1,70514671
NM_009452	<i>Tnfsf4(Ath1)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	1,39485459	5,61760462
NM_134138	<i>Psmg2</i>	Proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2	1,16473448	0,92658476
NM_011617	<i>Cd70</i>	CD70 antigen	1,76558006	1,70514671
NM_009403	<i>Tnfsf8(Cd30l)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	0,81224033	1,70514671
NM_009404	<i>Tnfsf9 (Ly63l)</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	4,31688922	1,94516595
NM_001033 161	<i>Tradd</i>	TNFRSF1A-associated via death domain	1,08673552	1,04246476
NM_009421	<i>Traf1</i>	Tnf receptor-associated factor 1	3,83705853	1,33792749
NM_009422	<i>Traf2</i>	Tnf receptor-associated factor 2	3,05243348	0,98636617
NM_011632	<i>Traf3</i>	Tnf receptor-associated factor 3	0,96593657	1,10957332
NM_010368	<i>Gusb</i>	Glucuronidase, beta	-	-
NM_013556	<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	-	-
NM_008302	<i>Hsp90ab1</i>	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	-	-
NM_008084	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	-
NM_007393	<i>Actb</i>	Actin, beta, cytoplasmic	-	-
SA_00106	<i>MGDC</i>	Mouse Genomic DNA Contamination	-	-
SA_00104	<i>RTC</i>	Reverse Transcription Control	-	-

SA_00104	<i>RTC</i>	Reverse Transcription Control	-	-
SA_00104	<i>RTC</i>	Reverse Transcription Control	-	-
SA_00103	<i>PPC</i>	Positive PCR Control	-	-
SA_00103	<i>PPC</i>	Positive PCR Control	-	-
SA_00103	<i>PPC</i>	Positive PCR Control	-	-

Plusieurs gènes de ménage ont été utilisés pour pondérer les valeurs mesurées pour les gènes testés. Les résultats des qPCR ont été analysés par la méthode  $\Delta\Delta C_t$  (Livak & Schmittgen, 2001). Le logiciel Inguinity a été utilisé pour visualiser les niveaux d'activation des gènes dans les différentes voies métaboliques et de signalisation, pour les trois lignées analysées (figure 28).

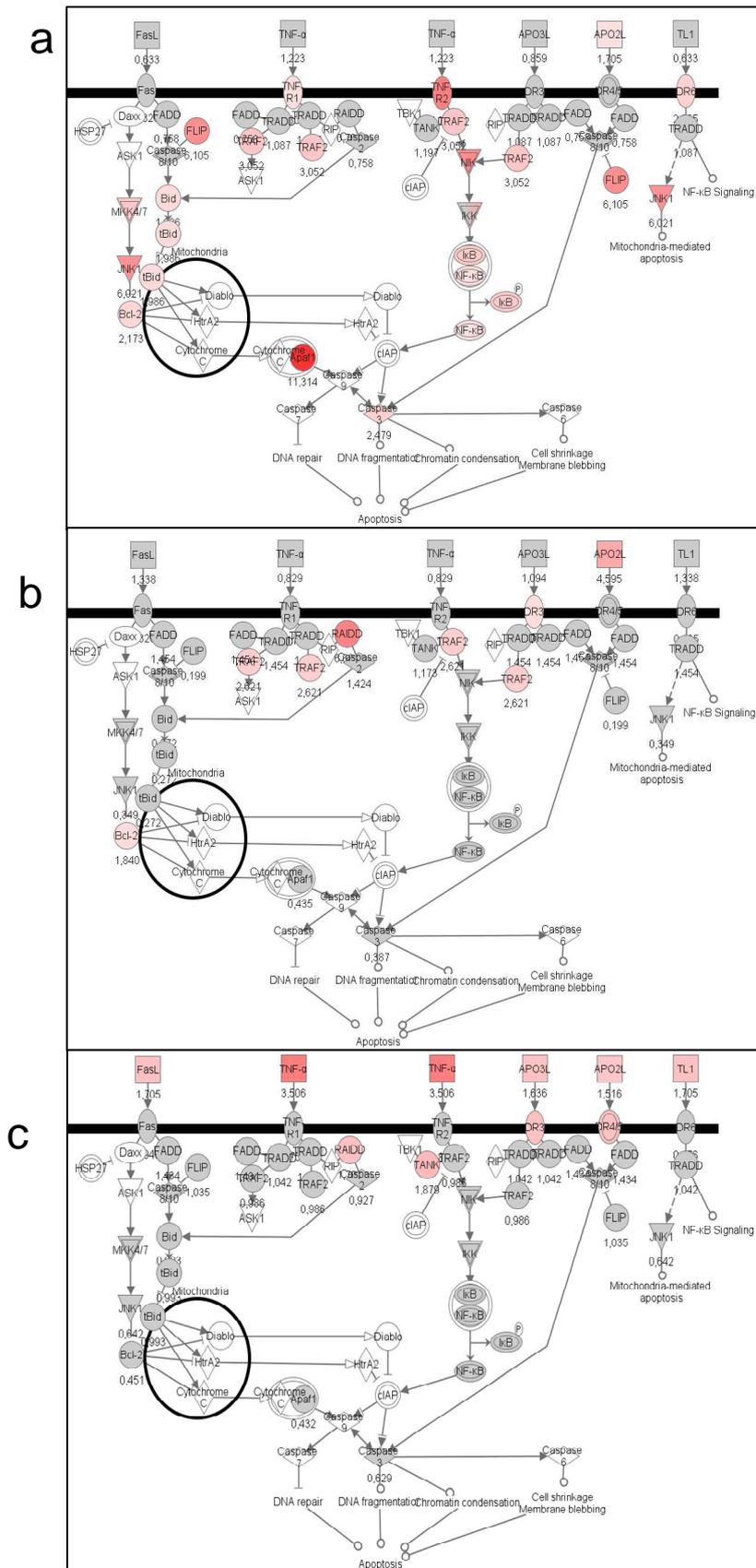
Les macrophages C57BL/6J ont montré une surexpression des deux récepteurs R1 (p55) et R2 (p75) au TNF. On observe une surexpression de plusieurs gènes situés dans les cascades d'activation en aval de ces deux récepteurs. Ainsi, la voie NF- $\kappa$ B en aval du récepteur R2 (gènes *Ikk*, *I $\kappa$ B*, *NF $\kappa$ B*) est surexprimée jusqu'au gène *Caspase3* qui est impliqué dans l'apoptose de la cellule. Il en est de même pour la voie située en aval du récepteur R1. Plusieurs gènes sont également activés, tels que *Bid*, *JNK*, *Bcl2*, *Apaf1*. Ils contribuent également à l'activation du gène *Caspase3*.

On note à l'inverse une très faible activation des voies de signalisation en réponse au TNF $\alpha$  dans les macrophages SEG/Pas. Les ligands ont présenté une forte surexpression mais seuls les gènes *Raidd* et *Tank* sont activés en aval des récepteurs, ce qui laisse à supposer que l'apoptose des cellules n'est pas induite comme chez les C57BL/6.

Les souris congéniques montrent des résultats intermédiaires entre les deux lignées parentales. Très peu de gènes sont activés chez ces souris. Les gènes *Raidd*, *DR3*, *Apo2L* sont surexprimés comme pour SEG/Pas et les gènes *Traf2* et *Bcl2* sont activés comme pour la lignée C57BL/6J.

Il semble donc que les différences de séquence identifiées dans le récepteur *Tnfrsf1a* soient associées à une activation plus faible des gènes situés en aval de ce récepteur dans la lignée SEG/Pas. Ces deux mutations ont donc des conséquences fonctionnelles.

Afin de quantifier l'hétérogénéité de réponse inter-individuelle dans chaque groupe, une seconde expérience similaire a été réalisée pour analyser les macrophages de chaque souris individuellement. Toutefois, pour une raison inconnue, les macrophages non induits présentaient un niveau d'IL-6 élevé témoignant d'une activation spontanée de la voie du TNF que l'ajout de TNF $\alpha$  n'a pratiquement pas augmenté.



**Figure 28 : Schéma des voies de signalisation activées par le  $TNF\alpha$  dans des macrophages péritonéaux.**(a) B6; (b) congéniques pour le chromosome 6; (c) SEG. Les gènes indiqués en rouge sont surexprimés après induction (facteur > 1,5). Les autres (en gris) ne présentent pas de surexpression après activation par le  $TNF\alpha$ .

### 3.10. Recherche de QTL à l'aide de lignées recombinantes congéniques interspécifiques

Le polymorphisme génétique et phénotypique qui existe entre lignées de laboratoire et souris sauvages peut être mis à profit en produisant des croisements en deux générations (croisement en retour ou F2). Toutefois, il est intéressant de pouvoir disposer de lignées stables (consanguines) dont le génome est un réassortiment des deux génomes parentaux. C'est sur cette idée que reposent les lignées recombinantes consanguines et recombinantes congéniques.

En raison de la stérilité des mâles F1, *Mus spretus* ne peut être utilisée que pour produire des lignées recombinantes congéniques (RCS). Loin d'être un inconvénient, les RCS ont une plus grande puissance pour disséquer un déterminisme multigénique et pour détecter des relations épistatiques entre QTL (cf paragraphe 1.2.4.4.3.).

#### 3.10.1. Construction et composition des lignées IRCS

Nous avons mis à profit une collection de lignées développées dans l'Unité de Génétique fonctionnelle de la Souris par Xavier Montagutelli depuis 20 ans. Les lignées recombinantes congéniques interspécifiques (IRCS) sont issues de croisements en retour répétés entre les lignées SEG/Pas et C57BL/6, suivis de croisements consanguins (Burgio *et al.*, 2007). Chaque lignée porte en moyenne 1,4% de génome SEG/Pas à l'état homozygote, dans un fonds C57BL/6. Cette contribution se présente sous la forme d'un ou quelques segment(s), en moyenne 3, dont la taille moyenne est d'environ 12 Mb. Au total, les 55 lignées de la collection couvrent environ 40% du génome. En comparant chaque lignée avec C57BL/6 pour un caractère d'intérêt, il est possible d'identifier rapidement des régions du génome contenant des gènes contrôlant ce caractère (Lhote *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle, 55 lignées IRCS sont toujours entretenues à l'Institut Pasteur et leur composition génétique est disponible sur le site :

<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Gfons/ircs/ircshome.htm>.

#### 3.10.2. Analyse de la sensibilité des lignées IRCS à *Y. pestis*

La différence de vulnérabilité à *Y. pestis* observée entre C57BL/6 et SEG/Pas étant contrôlée par plusieurs gènes, il nous a semblé que les IRCS pouvaient nous permettre d'identifier certains de ces gènes assez rapidement, bien que la couverture du génome ne soit que partielle. La comparaison de groupes homogènes d'animaux appartenant à des lignées consanguines fournissait une puissance importante pour détecter des QTL à effet faible. Il faut

noter qu'aucun des trois locus identifiés dans l'analyse du croisement BSB n'est représenté dans les IRCS.

Nous avons travaillé exclusivement sur les femelles et nous sommes fixé l'objectif d'évaluer le phénotype de chaque lignée sur 15 individus. Du fait que ceux-ci ne pouvaient pas être produits simultanément pour une même lignée, chaque expérience a comporté plusieurs dizaines d'individus appartenant à différentes lignées, ainsi qu'un groupe de 10 femelles C57BL/6 qui a servi de contrôle interne. Au total 53 IRCS ont été testées, au moins partiellement, au cours de 16 expériences. Pour 34 d'entre elles, au moins 10 animaux ont été testés. Seules 13 lignées ont été testées sur au moins 15 femelles. L'analyse de la collection des IRCS est donc encore incomplète.

L'analyse des IRCS repose sur la comparaison du phénotype de chaque lignée avec celui de C57BL/6. Dans notre cas, l'évaluation d'une lignée s'est étalée sur plusieurs expériences pouvant présenter une certaine variabilité entre elles. Nous avons pris en compte cette variabilité éventuelle dans l'analyse des deux paramètres habituels : le taux de survie final et le nombre de jours séparant l'infection de la mort chez les individus sensibles (latence). Considérant également que la plupart des lignées IRCS se comportaient comme C57BL/6, nous avons développé une méthode pour utiliser leurs données pour accroître la taille du groupe témoin.

Dans un premier temps, le taux global de survie de chaque lignée a été comparé par un test exact de Fisher au taux global de survie de C57BL/6, toutes expériences confondues. Ceci a permis d'identifier les lignées se comportant comme C57BL/6 (différence non significative au seuil  $p=0,2$ ). Dans un second temps, chaque lignée a été comparée à un ensemble comprenant C57BL/6 et toutes les lignées non différentes de C57BL/6 identifiées précédemment, en ne prenant en compte pour cet ensemble que les données obtenues dans les expériences où l'IRCS avait été testée.

Une approche similaire a été utilisée pour la latence. Dans un premier temps, la latence moyenne pour chaque lignée a été comparée à la latence globale de C57BL/6, toutes expériences confondues, pour identifier les lignées ne présentant pas de différence globale (non significative au seuil  $p=0,2$ ). Dans un second temps, pour chaque manip où l'IRCS a été testée, nous avons calculé la différence entre la latence de chaque souris IRCS et la latence moyenne d'un ensemble comprenant C57BL/6 et toutes les lignées non différentes de C57BL/6 identifiées précédemment. Les valeurs ainsi calculées pour chaque souris de l'IRCS ont été comparées à 0 par un test de Student. Un programme d'analyse spécifique a été écrit par Xavier Montagutelli pour automatiser

ces calculs. Compte tenu du nombre de lignées testées (environ 50), le seuil pour déclarer une différence significative devrait être de  $0,05 / 50 = 0,001$ . Toutefois, ce seuil apparaît trop sévère compte tenu du fait que les effets attendus peuvent être modestes. Nous avons choisi de prendre en compte les différences significatives au seuil de 0,01.

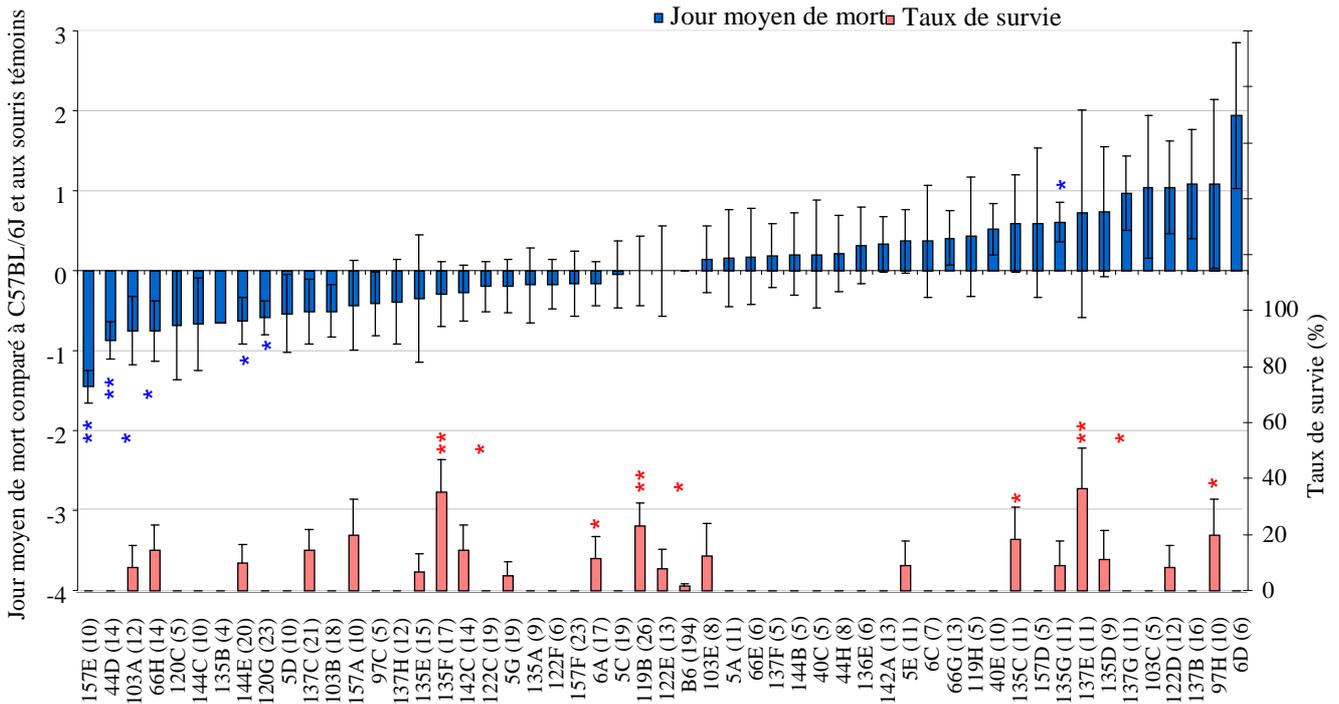
La figure 29 regroupe les résultats obtenus pour les 53 lignées IRCS testées. La partie inférieure représente le taux de survie calculé sur l'ensemble des expériences. Six lignées présentent des taux de survie significativement supérieurs à celui du groupe contrôle ( $p < 0,05$ ; 135F, 6A, 119B, 135C, 137E et 97H).

La partie supérieure du graphique présente la latence moyenne de chaque lignée, calculée par différence avec celle du groupe contrôle. La lignée C57BL/6 a reçu une valeur de 0. Les lignées mourant en moyenne plus rapidement que C57BL/6 se trouvent donc dans la moitié gauche du graphe. L'analyse a mis en évidence une distribution continue de la latence, qui peut être due à la fois à la relative imprécision de la mesure de ce paramètre, et au nombre de gènes impliqués dans son contrôle. Une seule lignée (135G) a présenté une latence significativement plus longue que C57BL/6 ( $p = 0,0367$ ). En revanche, 4 lignées ont montré une latence significativement plus courte que C57BL/6 ( $p < 0,05$ ; 157E, 44D, 144E et 120G). Pour plusieurs d'entre elles, d'autres souris ont été testées pour confirmer la différence observée. Enfin, les lignées présentant un taux de survie significativement supérieur à celui de B6 ne présentaient pas une latence significativement plus longue.

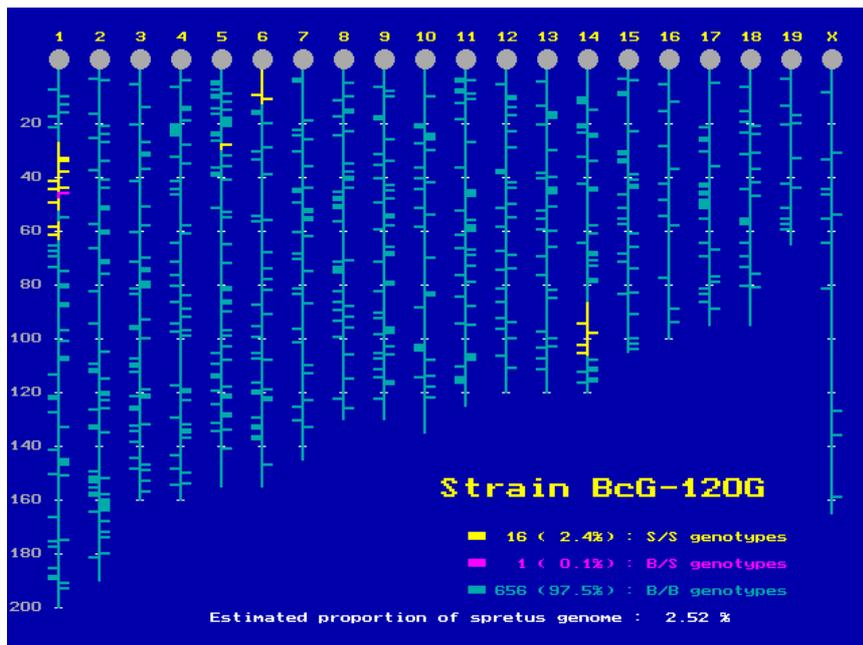
### 3.10.3. Recherche des gènes impliqués dans la vulnérabilité de la lignée 120G

La lignée 120G présente un taux de survie nul (sur 23 souris testées), avec une latence inférieure de 0,58 jours à celle du groupe contrôle. Le génotypage de cette lignée avec 700 marqueurs microsatellites et SNP avait mis en évidence la présence de trois segments d'origine SEG/Pas, en partie centromérique du chromosome 1, en partie centromérique du chromosome 6 et en partie télomérique du chromosome 14 (figure 30) (le fragment situé sur le chromosome 5 n'ayant pas été confirmé comme possédant l'allèle SEG/Pas lors de la vérification des génotypes). Pour identifier laquelle de ces régions était responsable de l'effet observé, nous avons produit un croisement (120GxB6)F2 pour faire ségréger ces segments. Les 67 souris (34 mâles et 33 femelles) produites ont été infectées selon le protocole habituel et génotypées pour 11 marqueurs microsatellites situés dans les trois régions.

Toutes les souris F2 ont succombé à l'infection. Nous avons recherché une éventuelle corrélation entre le jour de mort et le génotype et l'un des marqueurs à l'aide de R/qtl. Seuls deux



**Figure 29 : Phénotype des lignées IRCS.** L'axe horizontal supérieur (barres bleues) représente le jour moyen de mort des individus sensibles auquel a été déduit le jour moyen de mort des témoins testés dans les mêmes expériences que l'IRCS. Les témoins comprennent les souris B6 et les souris des IRCS ne montrant pas de différence significative par rapport à B6. L'axe inférieur (barres roses) représentent le taux de survie des souris IRCS. En abscisse, les noms des lignées sont notés avec, entre parenthèses, le nombre de souris testées par lignée.

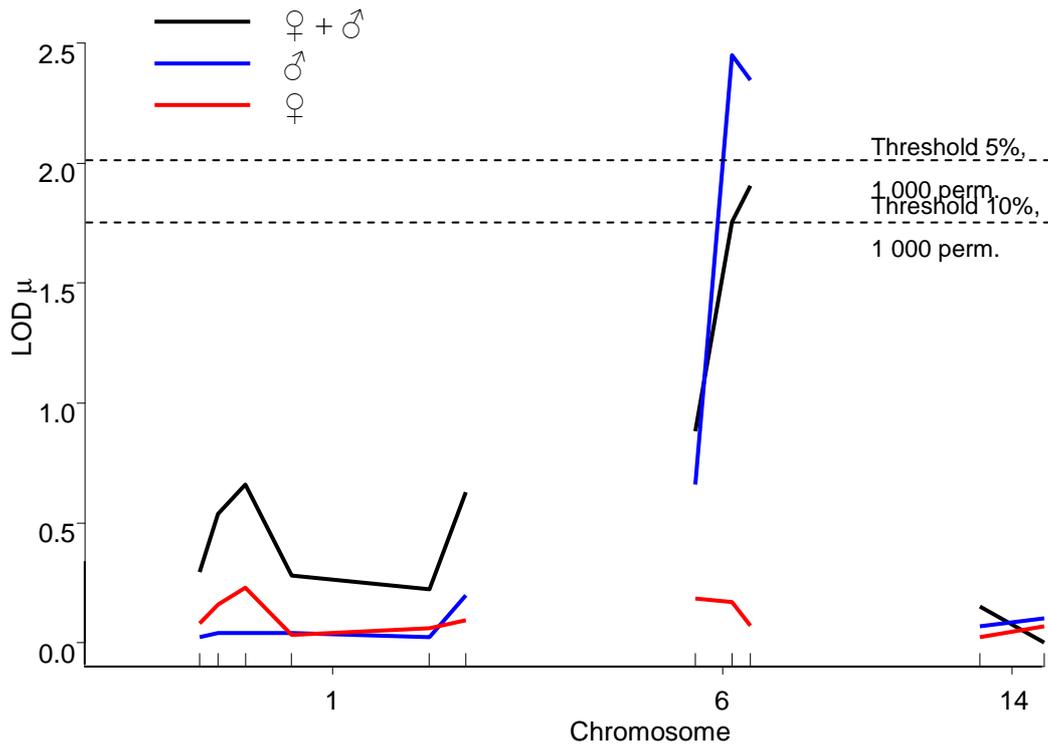


**Figure 30 : Carte génétique des lignées IRCS 120G.** Les régions chromosomiques d'origine SEG sont représentées en jaune et celles d'origine C57BL/6J sont en bleu.

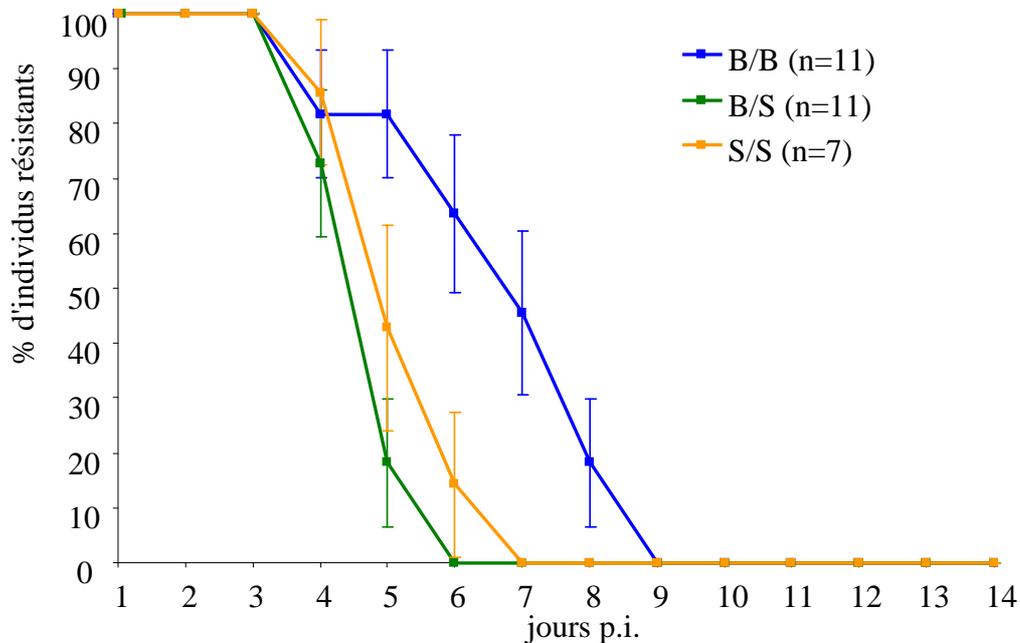
marqueurs sur le chromosome 6 ont montré une liaison, avec un  $LOD_{\mu}$  maximum de 1,9 (figure 31). En analysant séparément les sexes, nous avons observé que la liaison n'est retrouvée que pour les mâles ( $LOD_{\mu} = 2,45$ ), alors qu'elle est totalement absente chez les femelles. Chez les mâles, les individus B/S ou S/S pour le marqueur *D6Mit348* meurent significativement plus tôt que les individus B/B (figure 32; Logrank,  $p = 0,0023$ ).

Bien que la différence entre la lignée 120G et C57BL/6 ait été identifiée chez les femelles, c'est uniquement chez les mâles qu'un QTL a pu être identifié. Des mâles 120G devront être testés pour comparer leur phénotype avec celui de C57BL/6.

Le fragment du chromosome 6 sera isolé dans une lignée congénique pour étudier son effet seul. Compte tenu de la structure des IRCS, deux générations seront suffisantes.



**Figure 31 : Effet du génotype à chaque marqueur sur la durée de survie.** Courbes de LOD score établies par cartographie d'intervalle sur les (120G × B6)F2 sensibles. En abscisse figure les différents chromosomes. Les tirets indiquent les positions des marqueurs microsatellites analysés. Les seuils de significativité à 5 et 10% ont été calculés avec 1000 permutations sur l'ensemble des individus (n=69).



**Figure 32 : Courbes de survie en fonction du génotype au marqueur *D6Mit348*.** Les individus analysés sont les mâles issus de la population (120G × B6)F2. Les courbes sont significativement différentes en fonction du génotype au marqueur (p=0,0023).

# DISCUSSION GENERALE

#### **4. Discussion générale**

La peste a fait l'objet, depuis plusieurs dizaines d'années, de nombreuses études exploitant des modèles animaux. La plupart ont été réalisées chez des rongeurs, rats et souris, qui sont des hôtes naturels de la bactérie. Différents protocoles expérimentaux ont été décrits pour reproduire les deux formes principales de la peste. Un modèle de forme bubonique est obtenu par injection de la bactérie par voie sous-cutanée ou intra-dermique (Sebbane *et al.*, 2005), tandis que la forme pulmonaire, la plus rapide et la plus grave, est reproduite par exposition à un aérosol (Agar *et al.*, 2009) ou par instillation intra-nasale (Bubeck *et al.*, 2007).

##### 4.1. Résistance de la lignée SEG/Pas à la peste.

Notre travail a été réalisé à l'aide d'un modèle expérimental simple visant à reproduire au plus près l'infection naturelle conduisant à la forme bubonique de la maladie. Nous avons utilisé deux souches sauvages et virulentes de *Y. pestis* car nous voulions identifier des gènes et des mécanismes pertinents pour la pathologie humaine. Dans les deux cas, il s'agissait de souches isolées chez un patient et utilisées par d'autres laboratoires. Différents travaux réalisés à l'aide de souches de bactéries déficientes pour un facteur majeur de virulence ont permis de mettre en évidence des différences de vulnérabilité entre lignées de souris (Turner *et al.*, 2008) mais il est à craindre que les résultats obtenus ne permettent pas de réaliser de progrès significatifs sur la connaissance des mécanismes de pathogénicité de la bactérie en situation naturelle.

Nous avons choisi la voie d'inoculation sous-cutanée en région ventrale car elle est facile à réaliser sans avoir à anesthésier la souris et permet l'inoculation d'un volume assez précis (100 µl). Une alternative, peut-être plus proche de la piqûre de la puce, serait une inoculation par voie intradermique, par exemple dans le pavillon de l'oreille, mais ce geste est beaucoup plus délicat à réaliser et doit être fait sur animaux anesthésiés. En raison des nombres d'animaux nécessaires pour nos différentes études, et de la mauvaise résistance à l'anesthésie des souris sauvages (SEG/Pas en particulier), nous avons opté pour la voie sous-cutanée.

Dans ce modèle expérimental, la lignée SEG/Pas s'est distinguée de toutes les autres lignées testées par son extrême résistance. A partir de l'analyse rétrospective de différentes expériences préliminaires, nous avons montré que la dose de 100 ucf était celle pour laquelle le contraste avec C57BL/6 était le plus clair et le plus reproductible. Nous avons confirmé que cette résistance n'était pas spécifique de la souche CO92 de *Y. pestis* habituellement utilisée. Enfin, pour mesurer le niveau de résistance de SEG/Pas, nous avons infecté des groupes de souris avec

des doses croissantes de bactéries allant jusqu'à  $10^7$ , sans parvenir à entraîner la mort de plus de la moitié des animaux. Cette expérience a été répliquée car nous suspicions une erreur dans la préparation des dilutions de bactéries, mais les résultats ont été confirmés. Pour tenter d'expliquer cette forte résistance, nous avons imaginé que la lignée SEG/Pas, consanguine pour des allèles conférant une résistance à dose faible ou moyenne pouvait ségréger pour une mutation apportant une résistance à très forte dose. Selon cette hypothèse, les souris résistantes dans les groupes infectés à forte dose seraient porteuses de la mutation, au contraire des souris sensibles. Une analyse soigneuse du pedigree des animaux utilisés dans ces expériences nous a permis d'écarter cette hypothèse. Nous en avons conclu que les souris SEG/Pas étaient capables de mettre en place un mécanisme de résistance dépendant de la dose de bactérie inoculée, et que ce mécanisme n'était jamais saturé (tout au moins aux doses testées).

Nous avons pu montrer que la résistance de SEG/Pas se traduit par une plus grande probabilité de résister à l'infection. En revanche, les quelques individus qui en meurent succombent selon la même chronologie que les souris sensibles de la lignée C57BL/6J (supporting figure 7 de l'article). La différence concerne donc le taux de survie des souris mais pas le temps de survie des souris sensibles. Ceci nous conduit à formuler l'hypothèse que l'issue finale (mort ou survie) de la confrontation entre la bactérie et son hôte se joue probablement très précocement. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'observation d'un cinétique de la bactériémie très différente entre les souris SEG/PAS et C57BL/6J, dès le 2<sup>ème</sup> jour post-infection. Alors que la bactériémie connaît un pic précoce (au 2<sup>ème</sup> jour) et transitoire chez les souris SEG/PAS, elle apparaît plus tardivement chez les souris C57BL/6J mais croît de façon exponentielle (figure 23d). Ce résultat suggère un mécanisme mis en jeu avant le 2<sup>ème</sup> jour, différent entre les deux lignées. Comme nous le discutons dans l'article, cette expérience mériterait d'être réitérée dans des conditions un peu différentes, de façon à pouvoir comparer, dans chaque lignée, la bactériémie précoce des souris qui ont finalement survécu ou qui sont finalement mortes. Cela suppose que chaque souris puisse être conservée jusqu'au terme de l'évolution naturelle de l'infection, et que les prélèvements sanguins successifs ne doivent pas significativement perturber ces résultats.

Nous n'avons pas eu l'occasion de tester la sensibilité des souris SEG/Pas dans un modèle de forme pulmonaire. Ce modèle est mis en œuvre dans l'unité des *Yersinia*. Il est assez probable que la résistance exceptionnelle des souris SEG/Pas sera confirmée dans ce modèle, mais seule une étude physiopathologique fine permettra de comparer les mécanismes mis en jeu. Il faut souligner que, de ce point de vue, la récente construction d'une souche de *Y. pestis*

bioluminescente dans l'unité des *Yersinia* sera un outil très précieux pour suivre la prolifération et la dissémination de la bactérie dans une lignée sensible (C57BL/6J) et une lignée résistante (SEG).

Enfin, nous avons montré qu'il existe une différence de sensibilité entre mâles et femelles, ces dernières étant plus résistantes que les premiers. Cette observation n'est pas rare et a déjà été rapportée dans la littérature pour d'autres modèles infectieux (Whitacre *et al.*, 1999). Nous l'avons également observée au laboratoire pour le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift. Les femelles sont souvent plus résistantes que les mâles. L'un des mécanismes évoqués est un effet immunostimulateur des œstrogènes (par exemple, la stimulation de la réponse TH1). Les femelles inoculées avec le BCG montrent un taux d'IFN $\gamma$  dans le sérum plus élevé que les mâles (Huygen & Palfliet, 1984). L'administration de LPS a permis de mettre en évidence une production d'IL-1 et d'IL-6 supérieure chez les femelles par rapport aux mâles (Li *et al.*, 1995). Quelque soit le sens de cette différence, elle impose de travailler sur un seul sexe, ou tout au moins d'analyser les données des deux sexes séparément.

#### 4.2. Phénotype des autres lignées testées.

En dehors des lignées C57BL/6 et SEG/Pas, nous avons testé plusieurs lignées de laboratoire et de souris sauvages. Nous nous sommes basés sur l'arbre phylogénique proposé par Petkov et coll. (Petkov *et al.*, 2004) pour choisir un groupe de lignées couvrant la plus grande diversité génétique possible. Ce travail n'a pas été achevé car les résultats entre expériences n'étaient pas toujours concordant et les résultats de lignées telles que PWD (*M. musculus musculus*) C3H/HeJ et DBA/2 restent à confirmer.

En revanche, nous avons eu accès à plusieurs lignées établies à partir d'individus *Mus spretus* capturés dans différentes régions géographiques. Sur les lignées testées jusqu'à présent, SEB/Mpl (originaire d'Espagne) et SMZ/Mpl (originaire du Maroc) résistent aussi bien que SEG/Pas à une injection de 100 ufc, alors que les lignées STF/Pas (originaire de Tunisie) et SFM/Mpl (originaire de Montpellier) sont significativement plus sensibles. La lignée *Mus spretus* SPRET/Ei, largement utilisée dans la littérature, est en cours d'élevage pour obtenir les groupes d'animaux nécessaires à l'évaluation précise de son phénotype.

Il faut souligner que ces tests ont été réalisés dans nos conditions standardisées (100 ufc) et qu'il serait utile, pour affiner la mesure du niveau de résistance à la peste, d'infecter des

groupes d'individus de chaque lignée, avec des doses croissantes de bactéries comme nous l'avons fait pour SEG/Pas, afin de déterminer si possible une DL50.

#### 4.3. Identification de trois QTL à effet additif et spécifiques de sexe.

L'observation que les F1 entre C57BL/6J et SEG/Pas ne sont pas significativement moins sensibles que les SEG/Pas nous a conduit à faire l'hypothèse que la résistance des SEG était due à l'action d'allèles SEG/Pas dominants. Nous avons donc produit un croisement [(C57BL/6J x SEG/Pas)F1 x C57BL/6J] appelé BSB pour les localiser génétiquement. Dans un premier temps, nous avons concentré notre attention sur les femelles, celles-ci présentant la plus grande différence de sensibilité entre les lignées parentales. Ayant observé que les souris BSB ne différaient pas des lignées parentales pour la durée de survie moyenne des souris sensibles, que ce soit en valeur moyenne ou en variance, nous n'avons recherché des QTL que pour le taux de survie.

Nous avons ainsi identifié trois régions du génome qui agissent de façon significative sur le taux de survie des animaux. Dans les trois cas, l'allèle SEG était protecteur et associé à une augmentation d'environ 20% de la survie. En analysant les effets des locus considérés deux par deux, nous avons montré qu'ils agissaient de façon indépendante. Enfin, une analyse haplotypique a mis en évidence une addition des effets individuels, les animaux hétérozygotes pour les 3 QTL présentant un taux de survie comparable à celui des souris SEG/Pas. En revanche, le taux de survie élevé (32%) des souris homozygotes C57BL/6J aux trois QTL suggère qu'il existe d'autres QTL contrôlant la sensibilité à la peste, que nous n'avons pas pu identifier, probablement en raison de la faiblesse de leur effet. Au total, les trois QTL expliquent 61% de la différence de résistance entre les deux lignées parentales.

Sur la base des résultats obtenus sur les femelles BSB, nous avons proposé un modèle dans lequel chaque composition génétique est associée à une certaine capacité à contrôler l'infection (figure 6 de l'article). Par rapport à C57BL/6J, un ou plusieurs gènes non encore identifiés apportent un premier niveau de résistance. Chacun des trois QTL *Ypr11* à *3* accroît ce niveau jusqu'à atteindre celui de SEG

Sur le plan fonctionnel, le fait que trois gènes agissent de façon additive pour contrôler un phénotype peut suggérer deux mécanismes. Les trois gènes peuvent agir sur des voies métaboliques ou de signalisations indépendantes qui contribuent chacune aux capacités de survie

de l'individu. Ils peuvent également être impliqués dans la même cascade de réactions, dans chacune desquelles l'enzyme et le substrat sont en quantité non saturante.

L'analyse des mâles BSB n'a mis en évidence qu'un seul QTL, sur le chromosome 6, dans une région chevauchante avec l'intervalle de confiance de *Yprl3*. En revanche, les courbes de LOD score sont absolument plates pour les chromosomes 3 et 4, ce qui montre bien que les QTL *Yprl1* et 2 n'ont pas d'effet chez les mâles et qu'il ne s'agit pas d'un problème de puissance de détection dans le croisement (par exemple en raison de sa taille). Ce QTL du chromosome 6 est responsable d'une augmentation d'environ 34% du taux de survie entre mâles B/B et B/S, davantage que l'effet observé pour *Yprl3*. Là encore, d'autres gènes non identifiés sont responsables du niveau élevé de résistance des mâles B/B (presque 50%).

L'observation de QTL spécifiques de sexe dans le contrôle de la résistance à une maladie infectieuse n'est pas absolument nouvelle, même si elle n'est pas fréquente. Plusieurs exemples ont déjà été rapportés dans la littérature, concernant *Salmonella enteritidis* (Caron *et al.*, 2002; Caron *et al.*, 2005), *Salmonella typhimurium* {Roy, 2006 #50}, *mycobacterium bovis* (Turcotte *et al.*, 2006) ou le virus de l'encéphalomyélite de Theiler (Butterfield *et al.*, 2003).

L'analyse des individus du croisement en retour réciproque (BSS) n'a pas permis d'identifier de QTL significatifs, que ce soit pour le taux de survie que pour la latence. Ce croisement avait pour objectif de détecter d'éventuels allèles récessifs de SEG. Un seul QTL suggestif a été identifié sur le chromosome 10 avec un effet transgressif sur le phénotype, les individus S/S pour ce locus ayant un taux de survie significativement inférieur à celui des B/S. L'analyse séparée des mâles et des femelles n'a pas permis de mettre en évidence des QTL spécifique de sexe. Enfin, les QTL des chromosomes 3, 4 et 6 n'ont pas non plus été retrouvés, ce qui suggère que les allèles SEG de ces QTL sont strictement dominants.

Les trois régions chromosomiques que nous avons identifiées n'ont jamais été décrites précédemment dans la littérature. Ce n'est pas surprenant car aucun autre laboratoire n'a jamais testé la sensibilité de *Mus spretus* à *Y. pestis*, ni décrit un phénotype de résistance de cette ampleur. Les seuls travaux rapportant la localisation génétique de facteurs de résistance chez la souris ont été publiés par Turner et coll. dans un modèle d'infection par voie intraveineuse avec la souche KIM5 délétée pour le facteur de virulence *pgm*. Ils ont identifié un locus, appelé *prl1* et localisé sur le chromosome 17, en analysant les résultats d'un croisement en retour et d'une F2 entre les lignées BALBcJ, résistante, et C57BL/6J, sensible à la souche KIM5 *pgm*- (Turner *et al.*, 2008). Le locus *prl1* se trouve dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité qui est

très riche en gènes contrôlant de multiples aspects de la réponse immunitaire. Les souris congéniques pour l'allèle BALB/cJ de *prl1* dans un fonds C57BL/6 présentent la même charge bactérienne dans la rate 48h après infection que les souris BALB/cJ, confirmant ainsi l'effet de cette région génomique (Turner *et al.*, 2008).

#### 4.4. Caractérisation préliminaire de lignées consomique et congéniques.

La confirmation de l'existence des trois QTL et leur cartographie fine passait par la production de lignées congéniques que nous avons entreprise dès que nous avons eu les résultats préliminaires du croisement BSB. Nous avons été confrontés à d'importantes difficultés lors des générations successives, en raison de la faible fertilité des croisements interspécifiques. Près de 170 mâles et femelles N2 (équivalent de BSB) ont été mis en accouplement mais seulement une vingtaine d'entre eux ont eu des descendants.

Grâce à l'existence de la lignée consomique (presque complète) BcG6 pour le chromosome 6 dont nous disposons au laboratoire, nous pensions être en mesure de confirmer rapidement l'effet de *Yprl3* sur la survie des animaux. L'allèle SEG/Pas étant dominant, nous avons étudié des individus hétérozygotes que nous avons pu produire en grand nombre, et analyser séparément les deux sexes. Chez les mâles, nous n'avons observé aucune différence de taux de survie par rapport à C57BL/6J mais un retard de mortalité d'environ 2 jours. Chez les femelles, le taux de survie était également inchangé et le retard de mortalité était plus faible que chez les mâles. L'effet du fragment de chromosome 6 porté par la lignée consomique est donc très faible et bien inférieur à ce qui était attendu compte tenu de l'effet observé chez les BSB. Ce résultat décevant dans les deux sexes peut cependant s'expliquer par le modèle que nous avons proposé : il est probable que des facteurs génétiques non identifiés situés sur d'autres chromosomes sont capables de créer un environnement génétique favorable pour l'expression de l'effet du QTL du chromosome 6.

L'intervalle de confiance de *Yprl3* calculé chez les femelles recouvre une petite région chromosomique comprise entre les positions 124 et 128 Mb absente dans la lignée consomique. Lors de la production des lignées congéniques, nous avons pris soin de conserver cette région en incluant un marqueur microsatellite. Toutefois, même si elle contenait un gène responsable d'une différence importante de survie, l'effet phénotypique même faible observé avec la lignée consomique BcG6 indiquait qu'il devait y avoir au moins un gène en dehors de cette petite région capable d'influencer la réponse de l'hôte à l'infection.

Nous avons pu tester des souris des lignées congéniques en cours d'obtention. A la cinquième génération de croisement en retour, les souris possèdent encore en moyenne environ  $(1/2)^5 = 1/32 \sim 3\%$  de génome SEG dans le fonds C57BL/6J, dont la région sélectionnée. Nous avons produit des lignées simples ou doubles congéniques, c'est-à-dire portant une seule ou deux régions chromosomiques. Nous avons ainsi pu analyser 120 souris congéniques N5, principalement pour le chromosome 6. Certaines de ces souris portant des événements de recombinaison le long du chromosome, nous avons procédé à une analyse locus par locus. Chez les mâles, nous avons observé une très légère augmentation du taux de survie mais surtout un retard de mortalité très significatif entre individus B/B et B/S pour les marqueurs *D6Mit222* et *D6Mit184* qui se trouvent respectivement en position 39 et 53 Mb. Chez les femelles, nous n'avons noté aucun effet, ni sur le taux de survie, ni sur le temps de survie.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'allèle SEG/Pas de *Yprl3*, pris isolément sur un fonds C57BL/6J, possède un effet faible qui peut retarder un peu la mort des animaux, surtout chez les mâles, chez lesquels il semble avoir un effet plus fort, d'après les résultats des BSB, des consomiques et des congéniques. En revanche, il n'est pas capable, à lui seul, de déclencher ces événements précoces dont nous avons fait l'hypothèse précédemment, et qui contrôlent l'issue de l'infection. Il pourrait toutefois en amplifier les effets en présence d'autres allèles protecteurs.

L'analyse des lignées congéniques nécessitera d'étudier des phénotypes plus fins et ciblés que la mort ou la survie de l'animal. Des paramètres tels que la charge bactérienne dans différents organes, les taux de cytokines, les niveaux d'activation de différentes populations cellulaires, etc... devront être analysés pour pouvoir caractériser l'effet de chaque région génomique. C'est ainsi que Morel et coll. ont pu disséquer le contrôle génétique d'un modèle de lupus érythémateux disséminé chez la souris. Ils ont identifié, dans un backcross entre les lignées C57BL/6J (résistante) et NZM2410 (sensible) des locus de prédisposition au développement d'une glomérulonéphrite sur les chromosomes 1, 4 et 7 (respectivement appelé *Sle1*, *Sle2* et *Sle3*) (Morel *et al.*, 1994). Ces régions semblaient agir de façon additive sur la fréquence de glomérulonéphrite. Des lignées congéniques ont été produites en introduisant la région d'intérêt d'origine NZM2410 dans un fonds génétique C57BL/6J. Elles ont été analysées pour le développement de glomérulonéphrite mais également de différents paramètres immunologiques reflétant le niveau d'activation non spécifique de la réponse immunitaire, et la perte de tolérance aux antigènes du soi (taux d'IgM et d'IgG, IgG dirigées contre des antigènes nucléaires, etc...). Seule la lignée congénique pour *Sle3* a montré une augmentation de la fréquence de glomérulonéphrite par rapport à C57BL/6J, mais toutes les lignées ont présenté des anomalies

immunologiques variées qui ont permis d'attribuer un rôle propre à chaque région (Morel *et al.*, 1997). En réunissant les trois régions dans une seule lignée, les auteurs ont montré que les trois régions combinaient leurs effets pour induire une glomérulonéphrite lupique avec une fréquence identique à celle de la lignée parentale NZM2410 (Morel *et al.*, 2000). Cette analyse de sous-phénotypes sur les lignées congéniques, simples ou multiples, sera déterminante pour la suite de ce projet.

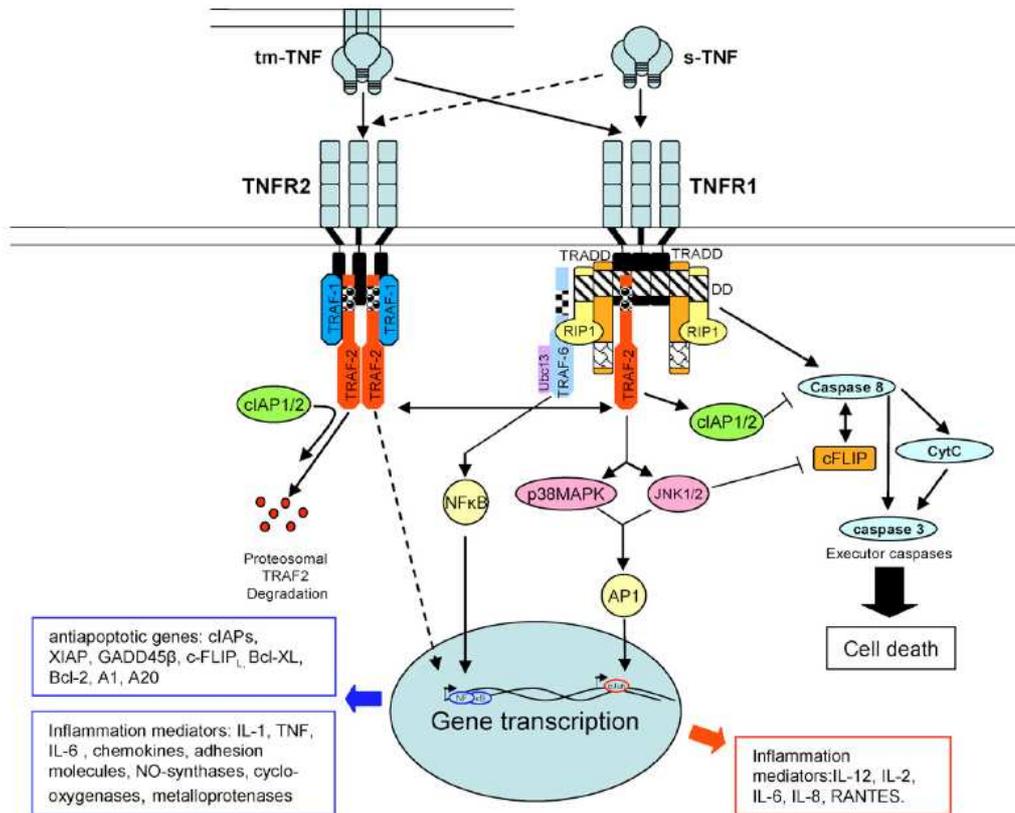
#### 4.5. Caractérisation de mutations dans le gène *Tnfrsf1a*.

Lorsque nous avons étudié la lignée consomique BcG6, nous avons constaté que le petit segment C57BL/6J inséré dans le grand segment SEG et situé entre les positions 124 et 128 Mb comportait le gène *Tnfrsf1a* pouvant représenter un intéressant candidat par sa fonction car il code pour le récepteur p55 du TNF $\alpha$ , un acteur majeur de la réponse inflammatoire.

Nous avons séquencé le gène *Tnfrsf1a* dans les lignées C57BL/6J et SEG/Pas et nous avons identifié plusieurs changements d'acides aminés dans la séquence codante. Pour identifier lequel de ces changements pouvait avoir une importance fonctionnelle, nous avons comparé la séquence de plusieurs lignées *Mus spretus* (SMZ/Mpl, SEB/Mpl, SFM/Mpl et STF/Pas) avec leur degré de résistance à une infection par 100 ufc de *Y. pestis*. Nous avons ainsi montré que les mutations R394H et A431T, située dans le Death Domain de la protéine. La mutation R394H est dans une région beaucoup plus conservée entre espèces que celle dans laquelle se trouve la mutation A431T.

Le DD est un point d'encrage pour de nombreuses molécules associées au récepteur qui vont agir dans l'induction de nombreux gènes impliqués dans la médiation inflammatoires ou la réponse antiapoptotique (par l'intermédiaire de *Traf2*, *Tradd* ou *Rip1*) (figure 33) ou dans la mort cellulaire (via *Fadd*) (Kruglov *et al.*, 2008).

Une étude faite par Staelens et coll. a montré que les souris SPRET/Ei étaient résistantes à une injection de 500  $\mu$ g de TNF alors que les souris C57BL/6J y étaient sensibles (Staelens *et al.*, 2002). L'analyse de 167 individus backcross entre ces deux lignées a montré que la réponse au TNF était contrôlée par deux locus sur les chromosomes 6 et 11. Un autre QTL, suggestif, a été identifié sur le chromosome 2. L'allèle SPRET aux QTL des chromosomes 2 et 6 semblaient avoir un effet protecteur alors que celui du chromosome 11 semblait accroître la sensibilité. Malgré des intervalles de confiance de grande taille, deux gènes candidats ont été étudiés. Le gène *Tnfrsf1a* situé sur le chromosome 6 est le récepteur principal du TNF alors que le gène



**Figure 33** : schéma des récepteurs *Tnfrsf1a* et *Tnfrsf1b* (*Tnf receptor p55* et *p75*) et des molécules associées à la signalisation intracellulaire suite à la fixation de son ligand  $TNF\alpha$ .

(D'après Kruglov AA et al., 2008)

*Traf2* (*TNF receptor-associated factor 2*) qui se situe dans l'intervalle du chromosome 2 est un gène impliqué dans l'activation de NF-κB après induction au TNF.

A l'aide fibroblastes embryonnaires (MEF) de souris SPRET/Ei, C57BL/6J et F1, les auteurs ont pu montrer que la voie de signalisation induisant la mort cellulaire via le récepteur p55 était fonctionnelle chez les souris SPRET/Ei. Les macrophages de SPRET/Ei et F1 montrent une production d'IL-6 significativement inférieure par rapport à C57BL/6J. La voie de signalisation induisant la production d'IL-6 semble donc déficiente chez ces souris. Tartaglia et coll. ont mis en évidence que certaines mutations dans la région proche de la membrane dans la partie intracellulaire du TNF récepteur p55 inhibait totalement l'induction de certains gènes (NO synthétase) mais n'affectait pas la cytotoxicité (Tartaglia *et al.*, 1993).

Il n'est donc pas surprenant que les valeurs d'IL-6 mesurées dans les surnageants des macrophages de SEG en culture soient très inférieures à celles obtenues chez les souris C57BL/6J. Les souris congéniques possédant pourtant le TNF récepteur p55 d'origine SEG/Pas montrent des taux d'IL-6 très proches de ceux de C57BL/6J ce qui laisse suggérer que le récepteur seul d'origine SEG/Pas dans un fond génétique C57BL/6J ne permet pas de d'induire cette variation phénotypique.

Dans le cadre des travaux de Staelens et coll., des souris congéniques possédant le gène *Tnfrsf1a* d'origine SEG/Pas ont été produites et phénotypées (Staelens *et al.*, 2002). Contre toute attente, ces souris se sont avérées sensibles à des doses importantes de TNF ce qui suggère qu'il existe d'éventuelles régulations en *trans* de ce gène qui, une fois isolé dans un autre fonds génétique, inhibe complètement sa fonctionnalité (Libert C., communication personnelle). Il est donc très difficile de conclure sur le rôle éventuel du *Tnfrsf1a* dans la résistance à *Y. pestis*.

L'observation que des souris p55<sup>-/-</sup> sur fonds C57BL/6J infectées par *Y. pestis* dans les conditions expérimentales habituelles meurent plus rapidement que les souris témoins montre que le gène *Tnfrsf1a* contribue à la résistance à *Y. pestis*. Si on extrapole ce résultat, l'allèle SEG/Pas du *Tnfrsf1a*, s'il est impliqué dans la résistance à *Y. pestis*, serait donc plutôt un gain de fonction par rapport à l'allèle de C57BL/6J. Les souris P55KO ont déjà été testées pour différents pathogènes comme *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis* BCG, *S. typhimurium*, *S. pneumoniae* et *L. monocytogenes* (Ehlers *et al.*, 2000; Flynn *et al.*, 1995; Lengeling *et al.*, 2001; Netea *et al.*, 2001; Pasparakis *et al.*, 1996; Pfeffer *et al.*, 1993; Rothe *et al.*, 1993). Quelque soit le pathogène, les souris p55KO sont plus sensibles que les souris témoins ce qui montre un rôle protecteur de ce gène dans la réponse aux infections.

La comparaison de l'expression des gènes de la voie de signalisation du TNF dans des macrophages péritonéaux de SEG/Pas, C57BL/6J et de congéniques hétérozygotes pour le chromosome 6 induits avec du TNF $\alpha$  a permis de mettre en évidence plusieurs différences. Si l'on compare les deux lignées parentales, nous pouvons observer que l'ensemble des gènes situés dans la cascade de signalisation sont surexprimés chez C57BL/6J jusqu'aux gènes induisant l'apoptose des cellules (*caspase 3*). En revanche, dans les macrophages SEG/Pas, on ne note pas de surexpression aussi diversifiée, mais seulement, et de façon très ciblée, une surexpression des récepteurs situés à la surface de la cellule et de leurs ligands. La comparaison des résultats obtenus sur les macrophages SEG/Pas et C57BL/6J se résume donc en une différence sur l'ensemble des gènes situés en aval du gène *Tank*.

Ces résultats restent à confirmer sur une expérience indépendante. S'ils sont reproduits avec le ligand spécifique de *Tnfrsf1a*, nous pourrions alors infecter des macrophages péritonéaux issus des deux lignées parentales avec *Y. pestis* et quantifier l'expression des gènes différenciellement exprimés dans la première étude. Ces résultats pourraient ainsi être expliqués en terme de mort cellulaire observée entre les deux lignées parentales.

#### 4.6. Gènes candidats dans les intervalles de confiance des QTL.

Malgré la taille importante des intervalles de confiance, nous avons recherché la présence d'éventuels gènes candidats par leur position et leur fonction à l'aide de la base de données Mouse Genome Informatics (MGI ; <http://www.informatics.jax.org/>).

L'intervalle de *Yprl1* regroupe près de 550 gènes, celui de *Yprl2* près de 300 gènes et celui de *Yprl3* près de 700 gènes. Pour les mâles, l'intervalle de confiance du QTL du chromosome 6 est inclus dans celui des femelles et comprend à peine 200 gènes.

Les différents gènes potentiellement intéressants peuvent être classés en plusieurs catégories selon leur fonction : les gènes impliqués dans la reconnaissance directe du pathogène dès son entrée dans l'organisme (aussi appelés « sensers »), les cytokines et leurs récepteurs, les gènes impliqués dans l'apoptose et les gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'inflammation.

Les gènes dits « sensers » sont des gènes cruciaux dans l'initiation et la coordination de la réponse immunitaire innée. Dans les intervalles de confiance définis pour nos QTL, plusieurs d'entre eux sont présents et peuvent avoir un rôle dans la réponse à l'infection par *Y. pestis*. Dans

l'intervalle de *Ypr11* se trouve un cluster de gènes de la famille des Killer Cell Lectin-like receptor (*Klr*) localisé entre les positions 128 et 130 Mb. Vingt sept gènes sont présents dans ce cluster : *Klra1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 17 et 23 ; *Klrb1a*, 1b, 1c et 1d ; *Klrc1*, 2 et 3 ; *Klrd1*, *Klrde1*, *Klrg1*, *Klri1* et 2 ; *Klrk2*. Les travaux de Diefenbach et coll. ont montré que les *Klr* étaient impliqués dans l'activation des cellules NK et notamment dans la régulation positive de la cytotoxicité de ces cellules et dans la stimulation de la voie de signalisation des récepteurs de lectines de type C (Diefenbach *et al.*, 2003). Les auteurs suggèrent aussi que *Klr* joue un rôle dans la régulation positive du processus de biosynthèse des oxydes nitriques et dans la régulation positive de la production d'interféron gamma. Desrosiers et coll. ont montré que le gène *Klra* (aussi appelé *Ly49*) était impliqué dans la résistance au Cytomegalovirus murin (MCMV) (Desrosiers *et al.*, 2005). Les cellules NK possédant ce récepteur Ly49 à la surface reconnaissent de façon spécifique les cellules infectées avec le MCMV en fonction de l'haplotype au niveau du complex majeur d'histocompatibilité (H-2D).

Les Toll Like Receptor (TLR) sont exprimés dans un nombre important de cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et certains de lymphocytes T ainsi que des cellules non immunes comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. Des études faites chez l'Homme ont montré des associations entre les maladies infectieuses et des polymorphismes dans les différents TLR ce qui suggère un rôle crucial de ces gènes dans la réponse de l'hôte face aux infections dans les populations humaines (Schroder & Schumann, 2005; Turvey & Hawn, 2006). Le récepteur TLR4 reconnaît de façon spécifique les lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface des bactéries Gram-négatif. Ce gène est un potentiel candidat dans le cadre de notre projet puisque *Y. pestis* est une bactérie Gram-négatif et que ce gène est situé à 66 Mb sur le chromosome 4, au milieu de l'intervalle de confiance de *Ypr12*. Son rôle dans la vulnérabilité à des infections bactériennes comme par exemple *M. tuberculosis* a déjà été décrit (Jo, 2008). Il joue aussi un rôle dans la réponse antivirale mais aussi antiparasitaire. Kurt-Jones et coll. ont montré que TLR4, en association avec CD14, reconnaissait la protéine de fusion du RSV (*respiratory syncytial virus*) (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Shoham et coll. ont montré que les souris TLR4 KO présentaient une hypersensibilité à l'infection par *Cryptococcus neoformans* (Shoham *et al.*, 2001). Toutefois, *Y. pestis*, une fois à 37°C, modifie la synthèse de ses LPS en forme tétra-acylée qui n'est plus reconnue par le récepteur TLR4 (Montminy *et al.*, 2006). Par conséquent, si TLR4 est impliqué dans la résistance à *Y. pestis*, la reconnaissance du LPS doit être faite dès l'entrée de la bactérie dans l'organisme.

Le gène *Nod1* se situe dans l'intervalle de confiance de *Ypr13*, à 55 Mb. NOD1 reconnaît des motifs de peptidoglycanes presque uniquement présents chez les bactéries Gram-négatif. En 2003, deux équipes ont identifié l'acide-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelic (iE-DAP) comme le ligand de NOD1 (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003). Ce récepteur intervient dans la reconnaissance des bactéries invasives et peut induire la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL1 ou l'IL8. NOD1 joue ainsi un rôle important lors d'infections par *Shigella flexneri* (Girardin *et al.*, 2001). Travassos et coll. ont montré que les délais de production de cytokines et l'élimination du pathogène étaient diminués lors d'une infection avec *P. aeruginosa* chez les souris déficientes en NOD1 (Travassos *et al.*, 2005). La responsabilité de NOD1 dans la détection d'*Helicobacter pylori* a également été montrée. Vialla et coll. ont observé une sensibilité accrue à ce pathogène pour les souris NOD1 KO (Viala *et al.*, 2004). *H. pylori*, pathogène extracellulaire, peut être détecté par NOD1, récepteur intracytoplasmique, en délivrant son peptidoglycane à l'intérieur de la cellule par un système de sécrétion de type IV.

Les gènes *Cd1d1* et *2*, situés dans l'intervalle de confiance de *Ypr11*, ont été décrits comme jouant un rôle important contre les pathogènes. CD1c est principalement trouvé au niveau des cellules dendritiques et peut être induit par les glycosphingolipides microbiens (Wu *et al.*, 2006) ou le dyacylglycocérole de *B. burgdorferi* (Kinjo *et al.*, 2006). Mattner J et coll. ont confirmé que la reconnaissance des glycosphingolipides des bactéries était dépendante de CD1d au niveau des cellules NKT comme par exemple pour *Ehrlichia muris* et *Sphingomonas capsulata* (Mattner *et al.*, 2005).

Les gènes *Pglyrp3* et *4*, situés également dans l'intervalle de confiance de *Ypr11*, codent pour des peptides antimicrobiens qui sont sécrétés par la peau, les yeux, la cavité orale et le tractus digestifs. Ils ont été décrits comme étant bactéricide à des concentrations allant de 0,1 à 1  $\mu\text{M}$  et nécessitant du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ils jouent un rôle important pour l'élimination des bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* et *S. aureus* mais sont moins efficaces contre les bactéries Gram-négatif. De plus, ils protègent les souris contre une infection pulmonaire à *S. aureus* (Kapetanovic & Cavaillon, 2007). Compte tenu de leur rôle dans diverses infections, il serait intéressant d'évaluer ce qu'il en est dans notre modèle d'infection par *Y. pestis*.

De nombreux gènes codant des cytokines et leurs récepteurs sont présents dans les intervalles de confiance des différents QTL. Au cours de l'infection, un ensemble de régulations

sont mises en œuvre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires qui interviennent dans la réponse innée.

Un cluster de gènes codant les interférons de type I se trouve sur le chromosome 4. Il comporte des gènes d'interférons  $\alpha$  (*Ifn*  $\alpha$  1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13 et 14),  $\beta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\kappa$  et zeta. Les intervalles de confiance de *Ypr1* 2 et 3 contiennent également plusieurs chimiokines : CCL19 (aussi appelée Exodus-3), CCL21 a, b, c (aussi appelées Exodus-2 ou TCA4), CCL27 a et b (aussi appelées ALP ou CTAK) et CXCL12 (aussi appelée sdf1). Enfin des gènes codants pour des récepteurs d'interleukines sont présents sur les chromosomes 3, 4 et 6 notamment l'Il5ra, Il6ra, Il11ra1 et 2, Il12rb2, Il17ra, c et e.

Buer J and Balling R (2003) ont répertorié dans leur revue le rôle de certaines cytokines, dont les récepteurs se situent dans nos intervalles de confiance, dans la réponse à diverses maladies infectieuses : TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  et  $\beta$ , IL6, IL12 dans la réponse à *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae* (Buer & Balling, 2003).

Cette longue énumération des gènes qui se trouvent dans les intervalles de confiance de nos QTL illustrent d'une part le grand nombre d'acteurs moléculaires impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives, et d'autre part la double nécessité de réduire la taille de ces intervalles et de caractériser finement les effets propres de chaque QTL.

#### 4.7. Contribution des IRCS dans l'identification de gènes de résistance

Pour localiser les gènes responsables de l'extrême résistance de SEG/Pas à *Y. pestis*, nous avons combiné deux stratégies. Les croisements en retour permettent d'explorer l'ensemble du génome mais ils ne peuvent détecter que des QTL à effet fort. L'analyse du jeu d'IRCS entre C57BL/6J et SEG/Pas offre davantage de puissance pour identifier des locus à effet faible mais ne donne accès qu'à environ 40% du génome.

Pour des raisons pratiques, nous n'avons analysé que les femelles de 53 IRCS. Pour certaines lignées, à cause d'une faible fertilité, nous n'avons pas pu analyser un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir conclure de façon définitive sur le phénotype de la lignée.

Le taux de survie et la durée de survie des souris sensibles ont été analysés séparément pour chaque lignée et comparés aux valeurs de C57BL/6J avec un objectif initial de tester 15 femelles par lignée. Parmi les 53 lignées étudiées, 6 lignées ont présenté un taux de survie

significativement supérieur à C57BL/6J, dont trois avec un degré de signification très élevé ( $p < 0,001$ ). Deux lignées, 135F et 135C, partagent un court segment d'origine SEG/Pas sur le chromosome 6, autour d'un marqueur SNP situé à 54 Mb, dans une région qui se trouve en région proximale de l'intervalle de confiance de *Yprl3*. La lignée 137E, qui résiste à plus de 30% ne porte qu'un segment d'origine SEG/Pas en région télomérique du chromosome 6, distalement par rapport au gène *Tnfrsf1a*. Le génotype précis de la lignée 119B doit être confirmé car les données actuelles indiquent la présence de deux fragments d'origine SEG/Pas, en région télomérique des chromosomes 2 et 15, avec certains marqueurs encore à l'état hétérozygote.

La durée de survie dans les différentes IRCS a montré une distribution continue, les extrêmes se situant à 1,5 jour de moins et à presque 2 jours de plus que C57BL/6J. Toutefois, en raison des faibles effectifs analysés pour certaines lignées, seule la lignée 135G a montré une mortalité significativement un peu plus tardive (0,6 jours) que C57BL/6J.

Quatre lignées ont montré une mortalité significativement précoce par rapport à C57BL/6J. Les lignées 44D et 157E sont celles pour lesquelles cette différence est la plus significative. En revanche, c'est pour la lignée 120G qu'elle a été identifiée en premier. Comme cette lignée porte 4 régions chromosomiques d'origine SEG/Pas, une F2 entre 120G et C57BL/6J a été produite pour identifier laquelle de ces régions est responsable de l'effet observé. L'analyse de 63 individus F2 (mâles et femelles) a mis en évidence une liaison significative entre la durée de survie et deux marqueurs en région très proximale du chromosome 6. L'allèle SEG/Pas confère une sensibilité accrue et se comporte comme un caractère dominant puisque les individus hétérozygotes ont le même phénotype que les individus homozygote SEG/Pas. Cette liaison n'est apparente que chez les mâles, alors que la lignée 120G a été étudiée seulement chez les femelles. D'autres individus devront être produits et analysés pour confirmer ce résultat. Le segment proximal du chromosome 6 devra être isolé dans une lignée congénique pour en étudier les effets.

Bien que toutes les lignées n'aient pas été testées complètement (15 femelles au minimum), les résultats obtenus sur les IRCS sont en partie inattendus. En effet, nous avons trouvé davantage de lignées survivant moins longtemps à l'infection que de lignées plus résistantes, contrairement à ce que l'apport de régions SEG/Pas dans le fonds C57BL/6J laissait supposer. Toutefois, les allèles "transgressifs" ne sont pas rares dans les analyses génétiques de caractères complexes. Il est également possible que cette sensibilité apportée par des allèles SEG/Pas résulte de la perturbation de réseaux d'interactions épistatiques qui fonctionnent moins

bien dès l'instant où l'un des éléments se retrouve sous une forme allélique SEG/Pas, alors que les autres sont d'origine C57BL/6J.

Du fait qu'il est possible d'analyser un nombre important d'animaux par lignée, les IRCS permettent de détecter des gènes dont l'effet sur le phénotype est modeste. C'est en effet ce que nous avons observé avec la durée de survie. Quelques différences observées par rapport à C57BL/6J sont très significatives et méritent d'être analysées plus avant. Les individus d'une même lignée ont souvent été testés dans plusieurs expériences et, même si nous avons mis au point un outil d'analyse nous permettant de tenir compte de l'hétérogénéité des résultats entre expériences, il faudra, pour ces quelques lignées prometteuses, augmenter la taille de l'élevage afin d'augmenter le nombre d'individus testés simultanément et obtenir des résultats plus solides.

Lorsque plusieurs IRCS partagent le même phénotype par rapport à la lignée receveuse (ici, C57BL/6J) et un ou plusieurs segments chromosomiques en commun, il est tentant de rechercher les gènes candidats parmi ces régions partagées. Cette approche, pour logique qu'elle soit, n'est pas complètement rigoureuse et il faut toujours préférer l'analyse d'une population F2 entre chaque lignée et C57BL/6J. Ceci apporte la preuve définitive d'une liaison entre le caractère et l'un des segments. A l'inverse, l'absence de liaison avec tous les marqueurs testés, doit inciter à rechercher l'existence de fragments SEG/Pas de petite taille et non encore détectés.

#### 4.8. Directions futures

##### 4.8.1. Modèle de résistance à la peste

Le modèle de peste sur lequel nous avons travaillé vise à reproduire la forme bubonique de la maladie. Plusieurs pistes sont envisageables pour mieux l'explorer et le valoriser. Il serait par exemple intéressant de comparer l'évolution de la bactériémie chez SEG/Pas après infection par des doses variées, y compris très élevées, pour voir si ces souris sont capables de contrôler la multiplication de la bactérie avec la même efficacité quelles que soient les conditions d'infection. L'inoculation de *Y. pestis* par voie intradermique dans le pavillon de l'oreille, si elle ne peut être envisagée sur des grandes séries d'animaux, permettrait de mieux suivre localement les événements directement liés à l'invasion initiale des tissus de l'hôte par la bactérie. Un autre champ à explorer concerne la peste pulmonaire, car on peut se demander si les mécanismes de résistance mis en jeu dans le modèle de peste bubonique seront également efficaces dans le cas d'une infection par les voies aériennes.

L'obtention récente, par l'unité des *Yersinia*, d'une souche de *Y. pestis* bioluminescente sera, de ce point de vue, extrêmement utile pour visualiser, sur l'animal entier et de façon longitudinale, la prolifération et la dissémination de la bactérie.

#### 4.8.2. Caractérisation génétique des locus *Yprl1*, 2 et 3 à l'aide des lignées congéniques

Les lignées congéniques en cours d'expansion seront un outil irremplaçable pour confirmer les trois QTL identifiés chez les femelles, montrer si *Yprl3* est bien identique au QTL identifié chez les mâles, étudier les effets individuels de chaque QTL, affiner leur localisation génétique et étudier leurs interactions. Pour ce dernier point, les lignées congéniques devront être croisées pour produire des lignées bi- ou tri-congéniques, ce que nous avons commencé à faire.

Les données préliminaires sur la lignée congénique pour *Yprl3* suggèrent que chaque locus pris isolément n'aura peut-être pas assez de force pour induire une augmentation détectable du taux de survie. Deux approches complémentaires devront être utilisées.

Premièrement, des sous-phénotypes moins globaux que la mort ou survie de l'animal devront être explorés. La cinétique de la bactériémie en est un. La mesure du taux de certaines cytokines ou le niveau d'activation de certaines populations cellulaires pourraient également apporter des informations. Là encore, l'imagerie *in vivo* pourra donner des pistes. Quoiqu'il en soit, la recherche de phénotypes discrets est absolument essentielle pour comprendre l'effet propre de chaque QTL.

Deuxièmement, il pourrait être judicieux de comparer des lignées bi- et tri-congéniques pour étudier l'effet de chaque QTL. Il est prévisible (nous l'espérons en tout cas) que les souris qui porteront les trois locus *Yprl* sur un fonds génétique C57BL/6J présenteront une élévation importante du taux de survie. Si c'est bien le cas, nous pourrions comparer ces souris tri-congéniques avec des souris bi-congéniques pour *Yprl1* et 2 et en déduire par différence l'effet de *Yprl3*. Cette approche permettrait de se situer dans une zone de résistance dans laquelle une différence sera détectable.

Une fois ces résultats acquis, les lignées congéniques seront de nouveau croisées avec C57BL/6J pour produire des chromosomes recombinants portant des segments SEG/Pas plus petits et chevauchants. L'effet phénotypique associé à chaque nouveau segment chromosomique nous permettra de réduire de proche en proche les bornes de l'intervalle de confiance.

#### 4.8.3. Recherche d'autres facteurs génétiques de résistance chez SEG/Pas

Les souris BSB qui ne portent aucun des trois locus *Yprl* résistent significativement mieux à la peste que des souris C57BL/6J, ce qui démontre l'existence d'autres locus que notre croisement n'est pas parvenu à identifier. Une stratégie pour les identifier pourrait être de produire un autre croisement en retour, en croisant cette fois-ci des souris SEG/Pas avec des souris tri-congéniques pour les locus *Yprl*. Les F1 seront croisées en retour avec des mâles tri-congéniques. Dans cette variante du croisement BSB, les deux lignées parentales, de même que toute leur descendance, seront homozygotes pour les trois QTL dont l'effet sera ainsi gommé. Il en résultera (au moins théoriquement) une plus grande capacité à détecter d'autres gènes influençant la résistance à la peste.

#### 4.8.4. Sous-phénotypes et caractérisation physiopathologique

L'une des deux parties du projet collaboratif concernait l'identification de différences physiopathologiques entre les souris sensibles C57BL/6J et les souris résistantes SEG/Pas. Jusqu'à présent, et malgré des explorations variées, il a été difficile de mettre en évidence des différences reproductibles et convaincantes. Toutefois, les données obtenues sur la cinétique de la bactériémie sont un premier élément solide.

Pour vérifier si notre hypothèse d'un mécanisme précoce qui détermine l'issue de l'infection est juste, il serait utile de faire, durant les 48 premières heures, une étude anatomo-pathologique et immuno-histochimique au point d'injection qui représente le premier site de multiplication bactérienne et d'interaction entre la bactérie et le système de défense de l'hôte. La voie intradermique dans le pavillon de l'oreille pourrait être indiquée pour ces études, en association avec des techniques d'imagerie *in vivo*.

Les mesures de température que nous avons faites lors d'une expérience pilote demandent à être confirmées. Nous recommandons, comme indiqué précédemment, d'infecter alors les souris SEG/Pas avec une forte dose ( $10^4$  ou davantage), afin d'avoir des proportions à peu près identiques d'individus résistants et sensibles, ce qui permettra de comparer des animaux au sein d'un même groupe en fonction de l'issue de l'infection.

#### 4.8.5. Etudes d'expression

L'analyse du transcriptome à grande échelle fait désormais partie des techniques facilement accessibles même si elle est encore assez onéreuse. Cette analyse permet d'étudier les

modifications de niveau d'expression des gènes dans un ensemble plus ou moins homogène de cellules, soumises ou non à un stimulus expérimental.

Nous avons montré que les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6J meurent en plus grand nombre après une infection *in vitro* avec *Y. pestis* que les macrophages de souris SEG/PAS. Par ailleurs, un plus grand nombre de gènes et donc de voies de régulation sont activés après une stimulation *in vitro* par le TNF $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que l'on pourrait obtenir des informations très utiles à partir de l'analyse du transcriptome de macrophages péritonéaux infectés *in vitro*. Cette expérience, relativement simple à réaliser, pourrait nous aider à identifier les voies de signalisation qui diffèrent de façon importante entre souris sensibles et résistantes. Elle présenterait l'avantage de pouvoir étudier un type cellulaire homogène et pertinent pour l'infection.

S'il s'avère que les souris SEG/Pas sont également capables de résister de façon plus importante que C57BL/6J à une infection intranasale mimant la peste pulmonaire, il serait envisageable d'analyser de même des macrophages issus de lavages broncho-alvéolaires.

Une expérience de cette nature a été réalisée au laboratoire en infectant des fibroblastes embryonnaires de souris résistantes ou sensibles avec le virus de la fièvre de la Vallée du Rift. En confrontant les modifications d'expression avec les résultats de l'analyse QTL réalisée d'après le phénotype de mort ou survie des animaux, il a été possible d'identifier un candidat différenciellement activé selon le phénotype de la lignée, et localisé près du pic de l'un des QTL.

#### 4.8.6. Etudes d'association

Chez l'homme, les études d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont révolutionné l'identification de facteurs de prédisposition à des maladies génétiques complexes. Chez la souris, une approche comparable est développée selon deux directions complémentaires.

Si l'on mesure précisément la vulnérabilité à la peste de plusieurs dizaines de lignées de souris (30 à 50), on peut comparer les phénotypes obtenus avec le génotype de ces mêmes lignées pour plusieurs centaines ou milliers de marqueurs SNPs. On identifie alors des associations avec certains variants alléliques qu'il est possible de confirmer expérimentalement par la suite. Toutefois, cette stratégie ne s'avère fructueuse que s'il existe soit une distribution assez large de valeurs phénotypiques, soit un équilibre entre lignées sensibles et résistantes. Dans notre cas, cela supposerait de disposer de plusieurs lignées présentant un niveau de résistance comparable à celui de SEG/Pas. Les quelques lignées de laboratoire que nous avons testées se

sont toutes révélées sensibles puisque leur taux de survie n'a jamais dépassé 25%. Néanmoins, en analysant plusieurs lignées dérivées à partir de géniteurs de l'espèce *Mus spretus*, nous avons pu en identifier au moins trois (SMZ/Mpl, SEB/Mpl et SFM/Mpl) qui présentent un niveau de résistance comparable à celui de SEG/Pas, alors que la lignée STF/Pas est sensible. La lignée SPRET/Ei est en cours d'expansion pour pouvoir être évaluée à son tour. Un croisement F2 entre les lignées SEG/Pas et STF/Pas a été produit et analysé. Un seul QTL sur le chromosome 8 a été identifié mais pas les locus *Ypr11*, 2 ou 3. Les autres lignées sont en cours de génotypage à très grande échelle (600.000 SNP) par le Center for Genome Dynamics (Jackson Laboratory). Ces données permettront de rechercher des corrélations entre génotype et phénotype, même si le nombre de lignées est faible.

Un des projets du laboratoire serait de tester un plus grand nombre de lignées pour leur sensibilité à *Y. pestis*, en tirant partie de l'extraordinaire collection de lignées entretenues au Jackson Laboratory. Critiquée pour le risque élevé de faux positifs et les biais introduits par l'analyse de lignées apparentées (Burgess-Herbert *et al.*, 2008), cette stratégie dite de *Haplotype Association Mapping* est intéressante en complément d'autres approches pour affiner la localisation génétique de QTL (Cervino *et al.*, 2007; Payseur & Place, 2007) et éliminer des gènes candidats dans un intervalle de confiance (Burgess-Herbert *et al.*, 2008). Pour identifier les faux positifs, il est nécessaire de confirmer les QTL identifiés par HAM à l'aide d'un croisement pour une analyse de liaison (Manenti *et al.*, 2009).

La seconde approche qui mériterait d'être développée et qui commence à donner des résultats préliminaires dans le domaine des maladies infectieuses est l'utilisation du Collaborative Cross (Churchill *et al.*, 2004). Très prochainement, plusieurs centaines de lignées établies à partir de croisements entre huit lignées parentales génétiquement divergentes (cinq lignées de laboratoire et trois lignées sauvages) seront disponibles. Elles seront génotypées à très grande échelle pour connaître de façon très précise leur composition génétique. Des algorithmes ont été développés pour rechercher des associations entre génotype et phénotype, et en particulier déterminer, en termes de probabilité, l'origine parentale des allèles (Mott *et al.*, 2000). Des simulations ont montré que dans le cas de croisement, il serait préférable, en termes de puissance de détection de QTL et de précision de leur localisation, de tester une souris par lignée pour un grand nombre de lignées, plutôt qu'un groupe de quelques souris pour un nombre plus modeste de lignées (Valdar *et al.*, 2006).

En conclusion, les résultats de notre travail illustrent la contribution que l'étude d'un modèle murin peut apporter à la compréhension et à l'identification de gènes de vulnérabilité d'une maladie infectieuse telle que la peste. Ces travaux vont permettre à terme la caractérisation de facteurs génétiques capables de conférer une résistance exceptionnelle à cet agent pathogène pourtant redoutable pour l'homme. Un large panel de stratégies pourra être mis en œuvre dans l'avenir pour la poursuite de cet objectif. Même si les variants alléliques qui seront identifiés chez la souris ne seront pas nécessairement retrouvés chez l'homme, ils fourniront des indices précieux sur les voies de signalisation et les mécanismes physiopathologiques qui, eux, présentent un degré de conservation élevé.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

WHO (2003). Human plague in 2000 and 2001. *Wkly Epidemiol Rec* **78**, 130-135.

Abdeltawab, N. F., Aziz, R. K., Kansal, R., Rowe, S. L., Su, Y., Gardner, L., Brannen, C., Nooh, M. M., Attia, R. R., Abdelsamed, H. A., Taylor, W. L., Lu, L., Williams, R. W. & Kotb, M. (2008). An unbiased systems genetics approach to mapping genetic loci modulating susceptibility to severe streptococcal sepsis. *PLoS Pathog* **4**, e1000042.

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A. & Carniel, E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14043-14048.

Adam-Klages, S., Schwandner, R., Adam, D., Kreder, D., Bernardo, K. & Kronke, M. (1998). Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* **63**, 678-682.

Agar, S. L., Sha, J., Foltz, S. M., Erova, T. E., Walberg, K. G., Baze, W. B., Suarez, G., Peterson, J. W. & Chopra, A. K. (2009). Characterization of the rat pneumonic plague model: infection kinetics following aerosolization of *Yersinia pestis* CO92. *Microbes Infect* **11**, 205-214.

Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J. F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Bernaudin, F., Jeppsson, O., Gollob, J. A., Meinel, E., Segal, A. W., Fischer, A., Kumararatne, D. & Casanova, J. L. (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**, 1432-1435.

Altare, F., Lammas, D., Revy, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Lamhamedi, S., Drysdale, P., Scheel-Toellner, D., Girdlestone, J., Darbyshire, P., Wadhwa, M., Dockrell, H., Salmon, M., Fischer, A., Durandy, A., Casanova, J. L. & Kumararatne, D. S. (1998). Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and *Salmonella enteritidis* disseminated infection. *J Clin Invest* **102**, 2035-2040.

Badalova, J., Svobodova, M., Havelkova, H., Vladimirov, V., Vojtiskova, J., Engova, J., Pilcik, T., Volf, P., Demant, P. & Lipoldova, M. (2002). Separation and mapping of multiple genes that control IgE level in *Leishmania major* infected mice. *Genes Immun* **3**, 187-195.

Bahmanyar, M., Fayaz, A., Nour-Salehi, S., Mohammadi, M. & Koprowski, H. (1976). Successful protection of humans exposed to rabies infection. Postexposure treatment with the new human diploid cell rabies vaccine and antirabies serum. *Jama* **236**, 2751-2754.

Bailey, R. R., Taylor, C. E. & Coles, M. A. (1971). Urinary infection and bacterial excretion-rates in urine. *Lancet* **1**, 187-188.

Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K. P., Whittle, H. C. & Hill, A. V. (1998). Variations in the NRAMPI gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* **338**, 640-644.

Bercovier, H., Alonso, J. M., Bentaiba, Z. N., Brault, J. & Mollaret, H. H. (1979). Contribution to the definition and the taxonomy of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **5**, 12-22.

- Bertherat, E., Lamine, K. M., Formenty, P., Thuier, P., Mondonge, V., Mitifu, A. & Rahalison, L. (2005).** [Major pulmonary plague outbreak in a mining camp in the Democratic Republic of Congo: brutal awakening of an old scourge]. *Med Trop (Mars)* **65**, 511-514.
- Bertherat, E., Bekhoucha, S., Chougrani, S., Razik, F., Duchemin, J. B., Houti, L., Deharib, L., Fayolle, C., Makrerougrass, B., Dali-Yahia, R., Bellal, R., Belhabri, L., Chaieb, A., Tikhomirov, E. & Carniel, E. (2007).** Plague reappearance in Algeria after 50 years, 2003. *Emerg Infect Dis* **13**, 1459-1462.
- Bishop, C. E., Boursot, P., Baron, B., Bonhomme, F. & Hatat, D. (1985).** Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* **315**, 70-72.
- Bonhomme, F. & Guénet, J. L. (1987).** The polyphyletic origin of laboratory inbred mice and their rate of evolution. *Biol J Lin Soc* **30**, 51-58.
- Bouloy, M. & Flick, R. (2009).** Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: Current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res.*
- Boyartchuk, V. L., Broman, K. W., Mosher, R. E., D'Orazio, S. E., Starnbach, M. N. & Dietrich, W. F. (2001).** Multigenic control of *Listeria monocytogenes* susceptibility in mice. *Nat Genet* **27**, 259-260.
- Boyden, E. D. & Dietrich, W. F. (2006).** Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38**, 240-244.
- Brahic, M. & Bureau, J. F. (1998).** Genetics of susceptibility to Theiler's virus infection. *Bioessays* **20**, 627-633.
- Broman, K. W. (2003).** Mapping quantitative trait loci in the case of a spike in the phenotype distribution. *Genetics* **163**, 1169-1175.
- Brubaker, R. R. (1991).** Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin Microbiol Rev* **4**, 309-324.
- Bubeck, S. S., Cantwell, A. M. & Dube, P. H. (2007).** Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infect Immun* **75**, 697-705.
- Buer, J. & Balling, R. (2003).** Mice, microbes and models of infection. *Nat Rev Genet* **4**, 195-205.
- Burgess-Herbert, S. L., Cox, A., Tsaih, S. W. & Paigen, B. (2008).** Practical applications of the bioinformatics toolbox for narrowing quantitative trait loci. *Genetics* **180**, 2227-2235.
- Burgio, G., Szatanik, M., Guenet, J. L., Arnau, M. R., Panthier, J. J. & Montagutelli, X. (2007).** Interspecific recombinant congenic strains between C57BL/6 and mice of the *Mus spretus* species: a powerful tool to dissect genetic control of complex traits. *Genetics* **177**, 2321-2333.

**Burt, R. A., Baldwin, T. M., Marshall, V. M. & Foote, S. J. (1999).** Temporal expression of an H2-linked locus in host response to mouse malaria. *Immunogenetics* **50**, 278-285.

**Butterfield, R. J., Roper, R. J., Rhein, D. M., Melvold, R. W., Haynes, L., Ma, R. Z., Doerge, R. W. & Teuscher, C. (2003).** Sex-specific quantitative trait loci govern susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelination. *Genetics* **163**, 1041-1046.

**Caron, J., Loredó-Osti, J. C., Laroche, L., Skamene, E., Morgan, K. & Malo, D. (2002).** Identification of genetic loci controlling bacterial clearance in experimental *Salmonella* enteritidis infection: an unexpected role of Nramp1 (Slc11a1) in the persistence of infection in mice. *Genes Immun* **3**, 196-204.

**Caron, J., Loredó-Osti, J. C., Morgan, K. & Malo, D. (2005).** Mapping of interactions and mouse congenic strains identified novel epistatic QTLs controlling the persistence of *Salmonella* Enteritidis in mice. *Genes Immun* **6**, 500-508.

**Cervino, A. C., Darvasi, A., Fallahi, M., Mader, C. C. & Tsinoremas, N. F. (2007).** An integrated in silico gene mapping strategy in inbred mice. *Genetics* **175**, 321-333.

**Chain, P. S., Carniel, E., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Stoutland, P. O., Regala, W. M., Georgescu, A. M., Vergez, L. M., Land, M. L., Motin, V. L., Brubaker, R. R., Fowler, J., Hinnebusch, J., Marceau, M., Medigue, C. *et al.* (2004).** Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13826-13831.

**Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez, G. & Inohara, N. (2003).** An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**, 702-707.

**Chanteau, S., Nato, F. & Migliani, R. (2003).** [Interest in rapid immunochromatography tests for surveillance of characteristic diseases epidemic in developing countries: the example of plague in Madagascar]. *Med Trop (Mars)* **63**, 574-576.

**Chapgier, A., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Vogt, G., Feinberg, J., Prochnicka-Chalufour, A., Casrouge, A., Yang, K., Soudais, C., Fieschi, C., Santos, O. F., Bustamante, J., Picard, C., de Beaucoudrey, L., Emile, J. F. *et al.* (2006).** Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet* **2**, e131.

**Churchill, G. A., Airey, D. C., Allayee, H., Angel, J. M., Attie, A. D., Beatty, J., Beavis, W. D., Belknap, J. K., Bennett, B., Berrettini, W., Bleich, A., Bogue, M., Broman, K. W., Buck, K. J., Buckler, E. *et al.* (2004).** The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet* **36**, 1133-1137.

**Congleton, Y. H., Wulff, C. R., Kerschen, E. J. & Straley, S. C. (2006).** Mice naturally resistant to *Yersinia pestis* Delta pgm strains commonly used in pathogenicity studies. *Infect Immun* **74**, 6501-6504.

**Cornelis, G. R. & Wolfwatz, H. (1997).** The *Yersinia* Yop virulon: A bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**, 861-867.

- Cornelis, G. R. (2002).** The *Yersinia* YSC-YOP 'type III' weaponry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 742-752.
- Cuénot, L. (1902).** La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez la souris. *Arch Zool exp gen* **3° série 10**, XXVII-XXX.
- Darvasi, A. (1998).** Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet* **18**, 19-24.
- Davis, K. J., Fritz, D. L., Pitt, M. L., Welkos, S. L., Worsham, P. L. & Friedlander, A. M. (1996).** Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch Pathol Lab Med* **120**, 156-163.
- Dejager, L., Libert, C. & Montgutelli, X. (2009).** Thirty years of *Mus spretus*: a promising future. *Trends Genet* **25**, 234-241.
- Demant, P. & Hart, A. A. (1986).** Recombinant congenic strains--a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. *Immunogenetics* **24**, 416-422.
- Demant, P. (1992).** Genetic resolution of susceptibility to cancer--new perspectives. *Semin Cancer Biol* **3**, 159-166.
- Desrosiers, M. P., Kielczewska, A., Loredó-Osti, J. C., Adam, S. G., Makrigiannis, A. P., Lemieux, S., Pham, T., Lodoen, M. B., Morgan, K., Lanier, L. L. & Vidal, S. M. (2005).** Epistasis between mouse *Klra* and major histocompatibility complex class I loci is associated with a new mechanism of natural killer cell-mediated innate resistance to cytomegalovirus infection. *Nat Genet* **37**, 593-599.
- Diefenbach, A., Hsia, J. K., Hsiung, M. Y. & Raulet, D. H. (2003).** A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* **33**, 381-391.
- DiPetrillo, K., Wang, X., Stylianou, I. M. & Paigen, B. (2005).** Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet* **21**, 683-692.
- Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Babinet, C., Cossart, P. & Lecuit, M. (2008).** Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455**, 1114-1118.
- Drozdov, I. G., Anisimov, A. P., Samoilova, S. V., Yezhov, I. N., Yereimin, S. A., Karlyshev, A. V., Krasilnikova, V. M. & Kravchenko, V. I. (1995).** Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis. *J Med Microbiol* **42**, 264-268.
- Du, Y. D., Rosqvist, R. & Forsberg, A. (2002).** Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun* **70**, 1453-1460.

**Ehlers, S., Kutsch, S., Ehlers, E. M., Benini, J. & Pfeffer, K. (2000).** Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55<sup>-/-</sup> mice is dependent on T cells and IL-12. *J Immunol* **165**, 483-492.

**Ewart-Toland, A., Briassouli, P., de Koning, J. P., Mao, J. H., Yuan, J., Chan, F., MacCarthy-Morrogh, L., Ponder, B. A., Nagase, H., Burn, J., Ball, S., Almeida, M., Linardopoulos, S. & Balmain, A. (2003).** Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet* **34**, 403-412.

**Ferris, S. D., Sage, R. D. & Wilson, A. C. (1982).** Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. *Nature* **295**, 163-165.

**Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Haverkamp, M. H., Vinolo, E., Ku, C. L., Puel, A., Frucht, D. M., Christel, K., von Bernuth, H., Jouanguy, E., Feinberg, J., Durandy, A., Senechal, B., Chagnier, A., Vogt, G. *et al.* (2006).** X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* **203**, 1745-1759.

**Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., Schreiber, R., Mak, T. W. & Bloom, B. R. (1995).** Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* **2**, 561-572.

**Fortin, A., Stevenson, M. M. & Gros, P. (2002).** Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. *Genes Immun* **3**, 177-186.

**Fortin, A., Abel, L., Casanova, J. L. & Gros, P. (2007).** Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**, 163-192.

**Franz, D. R., Jahrling, P. B., Friedlander, A. M., McClain, D. J., Hoover, D. L., Bryne, W. R., Pavlin, J. A., Christopher, G. W. & Eitzen, E. M., Jr. (1997).** Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *Jama* **278**, 399-411.

**Frazer, K. A., Eskin, E., Kang, H. M., Bogue, M. A., Hinds, D. A., Beilharz, E. J., Gupta, R. V., Montgomery, J., Morensoni, M. M., Nilsen, G. B., Pethiyagoda, C. L., Stuve, L. L., Johnson, F. M., Daly, M. J., Wade, C. M. & Cox, D. R. (2007).** A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* **448**, 1050-1053.

**Galimand, M., Carniel, E. & Courvalin, P. (2006).** Resistance of Yersinia pestis to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3233-3236.

**Galvan, E. M., Lasaro, M. A. S. & Schifferli, D. M. (2008).** Capsular antigen fraction 1 and pla modulate the susceptibility of Yersinia pestis to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin. *Infect Immun* **76**, 1456-1464.

**Girardin, S. E., Tournebize, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. (2001).** CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. *EMBO Rep* **2**, 736-742.

- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. (2003).** Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**, 1584-1587.
- Govoni, G., Vidal, S., Gauthier, S., Skamene, E., Malo, D. & Gros, P. (1996).** The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 allele. *Infect Immun* **64**, 2923-2929.
- Guénet, J. L. & Bonhomme, F. (2003).** Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet* **19**, 24-31.
- Higgins, J. A., Ezzell, J., Hinnebusch, B. J., Shipley, M., Henschel, E. A. & Ibrahim, M. S. (1998).** 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* **36**, 2284-2288.
- Hill, A. V. (2006).** Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet* **40**, 469-486.
- Hinnebusch, B. J., Fischer, E. R. & Schwan, T. G. (1998).** Evaluation Of the Role Of the *Yersinia pestis* Plasminogen Activator and Other Plasmid-Encoded Factors In Temperature-Dependent Blockage Of the Flea. *J Infect Dis* **178**, 1406-1415.
- Hinnebusch, B. J., Rosso, M. L., Schwan, T. G. & Carniel, E. (2002).** High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. *Mol Microbiol* **46**, 349-354.
- Hinnebusch, B. J., Rudolph, A. E., Cherepanov, P., Dixon, J. E., Schwan, T. G. & Forsberg, A. (2002).** Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**, 733-735.
- Hinnebusch, J. & Schwan, T. G. (1993).** New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. *J Clin Microbiol* **31**, 1511-1514.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. & Goeddel, D. V. (1996).** TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.
- Hudgins, C. C., Steinberg, R. T., Klinman, D. M., Reeves, M. J. & Steinberg, A. D. (1985).** Studies of consomic mice bearing the Y chromosome of the BXSB mouse. *J Immunol* **134**, 3849-3854.
- Huygen, K. & Palfliet, K. (1984).** Strain variation in interferon gamma production of BCG-sensitized mice challenged with PPD II. Importance of one major autosomal locus and additional sexual influences. *Cell Immunol* **85**, 75-81.
- Inglesby, T. V., Grossman, R. & O'Toole, T. (2001).** A plague on your city: observations from TOPOFF. *Clin Infect Dis* **32**, 436-445.

**Jo, E. K. (2008).** Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr Opin Infect Dis* **21**, 279-286.

**Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Lammas, D., Dorman, S. E., Fondaneche, M. C., Dupuis, S., Doffinger, R., Altare, F., Girdlestone, J., Emile, J. F., Ducoulombier, H., Edgar, D., Clarke, J., Oxelius, V. A., Brai, M. et al. (1999).** A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* **21**, 370-378.

**Kapetanovic, R. & Cavaillon, J. M. (2007).** Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. *Expert Opin Biol Ther* **7**, 907-918.

**Kerschen, E. J., Cohen, D. A., Kaplan, A. M. & Straley, S. C. (2004).** The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* **72**, 4589-4602.

**Kim, K. I., Kim, S. R., Sasase, N., Taniguchi, M., Harada, S., Kinoshita, K., Kim, S. H., Akimoto, Y., Shikata, M., Kimura, N., Izawa, S., Ohtani, A., Nakao, K., Motojima, M., Kinoshita, M. et al. (2006).** 2',5'-Oligoadenylate synthetase response ratio predicting virological response to PEG-interferon-alpha2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pharm Ther* **31**, 441-446.

**Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M. R., Zajonc, D. M., Ben-Menachem, G., Ainge, G. D., Painter, G. F., Khurana, A., Hoebe, K., Behar, S. M., Beutler, B., Wilson, I. A., Tsuji, M., Sellati, T. J., Wong, C. H. & Kronenberg, M. (2006).** Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* **7**, 978-986.

**Knechel, N. A. (2009).** Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit Care Nurse* **29**, 34-43; quiz 44.

**Kramnik, I., Dietrich, W. F., Demant, P. & Bloom, B. R. (2000).** Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8560-8565.

**Kruglov, A. A., Kuchmiy, A., Grivennikov, S. I., Tumanov, A. V., Kuprash, D. V. & Nedospasov, S. A. (2008).** Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 231-244.

**Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J. & Finberg, R. W. (2000).** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**, 398-401.

**Lander, E. S. & Botstein, D. (1989).** Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**, 185-199.

**Lathem, W. W., Crosby, S. D., Miller, V. L. & Goldman, W. E. (2005).** Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17786-17791.

- Lathem, W. W., Price, P. A., Miller, V. L. & Goldman, W. E. (2007).** A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science* **315**, 509-513.
- Lavebratt, C., Apt, A. S., Nikonenko, B. V., Schalling, M. & Schurr, E. (1999).** Severity of tuberculosis in mice is linked to distal chromosome 3 and proximal chromosome 9. *J Infect Dis* **180**, 150-155.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B. & Cossart, P. (1999).** A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**, 3956-3963.
- Lengeling, A., Pfeffer, K. & Balling, R. (2001).** The battle of two genomes: genetics of bacterial host/pathogen interactions in mice. *Mamm Genome* **12**, 261-271.
- Lesic, B. & Carniel, E. (2005).** Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **187**, 3352-3358.
- Levison, M. E. (2000).** Lessons Learned from History on Mode of Transmission for Control of Pneumonic Plague. *Curr Infect Dis Rep* **2**, 269-271.
- Lhote, D., Serres, C., Laissue, P., Oulmouden, A., Rogel-Gaillard, C., Montagutelli, X. & Vaiman, D. (2007).** Centimorgan-range one-step mapping of fertility traits using Interspecific Recombinant Congenic Mice. *Genetics*.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J. & et al. (1995).** Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**, 401-411.
- Lim, J. K., Lisco, A., McDermott, D. H., Huynh, L., Ward, J. M., Johnson, B., Johnson, H., Pape, J., Foster, G. A., Kryzstof, D., Follmann, D., Stramer, S. L., Margolis, L. B. & Murphy, P. M. (2009).** Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog* **5**, e1000321.
- Lipoldova, M., Svobodova, M., Krulova, M., Havelkova, H., Badalova, J., Nohynkova, E., Holan, V., Hart, A. A., Volf, P. & Demant, P. (2000).** Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. *Genes Immun* **1**, 200-206.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Loiez, C., Herwegh, S., Wallet, F., Armand, S., Guinet, F. & Courcol, R. J. (2003).** Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **41**, 4873-4875.
- Lynch, M. & Walsh, B. (1998).** *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

- Mahler, K. L., Fleming, J. L., Dworkin, A. M., Gladman, N., Cho, H. Y., Mao, J. H., Balmain, A. & Toland, A. E. (2008).** Sequence divergence of *Mus spretus* and *Mus musculus* across a skin cancer susceptibility locus. *BMC Genomics* **9**, 626.
- Malhotra, D., Darvishi, K., Lohra, M., Kumar, H., Grover, C., Sood, S., Reddy, B. S. & Bamezai, R. N. (2006).** Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of *PARK2* and *PACRG* genes with leprosy in an Indian population. *Eur J Hum Genet* **14**, 438-442.
- Manenti, G., Galvan, A., Pettinicchio, A., Trincucci, G., Spada, E., Zolin, A., Milani, S., Gonzalez-Neira, A. & Dragani, T. A. (2009).** Mouse genome-wide association mapping needs linkage analysis to avoid false-positive Loci. *PLoS Genet* **5**, e1000331.
- Manichaikul, A. & Broman, K. W. (2009).** Binary trait mapping in experimental crosses with selective genotyping. *Genetics* **182**, 863-874.
- Manly, K. F., Cudmore, R. H., Jr. & Meer, J. M. (2001).** Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome* **12**, 930-932.
- Marathe, R., Guan, Z., Anandalakshmi, R., Zhao, H. & Dinesh-Kumar, S. P. (2004).** Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Mol Biol* **55**, 501-520.
- Marketon, M. M., DePaolo, R. W., DeBord, K. L., Jabri, B. & Schneewind, O. (2005).** Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**, 1739-1741.
- Marshall, K. E., Godden, E. L., Yang, F., Burgers, S., Buck, K. J. & Sikela, J. M. (2002).** In silico discovery of gene-coding variants in murine quantitative trait loci using strain-specific genome sequence databases. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0078.
- Mashimo, T., Lucas, M., Simon-Chazottes, D., Frenkiel, M. P., Montagutelli, X., Ceccaldi, P. E., Deubel, V., Guenet, J. L. & Despres, P. (2002).** A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11311-11316.
- Matin, A., Collin, G. B., Asada, Y., Varnum, D. & Nadeau, J. H. (1999).** Susceptibility to testicular germ-cell tumours in a 129.MOLF-Chr 19 chromosome substitution strain. *Nat Genet* **23**, 237-240.
- Mattner, J., DeBord, K. L., Ismail, N., Goff, R. D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., Hoebe, K., Schneewind, O., Walker, D., Beutler, B., Teyton, L., Savage, P. B. & Bendelac, A. (2005).** Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* **434**, 525-529.
- McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B. & Dixon, J. E. (2003).** The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* **278**, 18514-18523.
- Miller, L. H., Good, M. F. & Milon, G. (1994).** Malaria pathogenesis. *Science* **264**, 1878-1883.

- Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M. F., Nantel, A., Stevenson, M. M. & Gros, P. (2003).** Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat Genet* **35**, 357-362.
- Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M. F., Gros, P. & Stevenson, M. M. (2004).** Phenotypic expression of pyruvate kinase deficiency and protection against malaria in a mouse model. *Genes Immun* **5**, 168-175.
- Min-Oo, G., Tam, M., Stevenson, M. M. & Gros, P. (2007).** Pyruvate kinase deficiency: correlation between enzyme activity, extent of hemolytic anemia and protection against malaria in independent mouse mutants. *Blood Cells Mol Dis* **39**, 63-69.
- Mira, M. T., Alcais, A., Nguyen, V. T., Moraes, M. O., Di Flumeri, C., Vu, H. T., Mai, C. P., Nguyen, T. H., Nguyen, N. B., Pham, X. K., Sarno, E. N., Alter, A., Montpetit, A., Moraes, M. E., Moraes, J. R. et al. (2004).** Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* **427**, 636-640.
- Mitsos, L. M., Cardon, L. R., Fortin, A., Ryan, L., LaCourse, R., North, R. J. & Gros, P. (2000).** Genetic control of susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Genes Immun* **1**, 467-477.
- Mitsos, L. M., Cardon, L. R., Ryan, L., LaCourse, R., North, R. J. & Gros, P. (2003).** Susceptibility to tuberculosis: a locus on mouse chromosome 19 (Tr1-4) regulates *Mycobacterium tuberculosis* replication in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6610-6615.
- Montagutelli, X., Serikawa, T. & Guenet, J. L. (1991).** PCR-analyzed microsatellites: data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains. *Mamm Genome* **1**, 255-259.
- Montminy, S. W., Khan, N., McGrath, S., Walkowicz, M. J., Sharp, F., Conlon, J. E., Fukase, K., Kusumoto, S., Sweet, C., Miyake, K., Akira, S., Cotter, R. J., Goguen, J. D. & Lien, E. (2006).** Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat Immunol* **7**, 1066-1073.
- Morel, L., Rudofsky, U. H., Longmate, J. A., Schiffenbauer, J. & Wakeland, E. K. (1994).** Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity* **1**, 219-229.
- Morel, L., Mohan, C., Yu, Y., Croker, B. P., Tian, N., Deng, A. & Wakeland, E. K. (1997).** Functional dissection of systemic lupus erythematosus using congenic mouse strains. *J Immunol* **158**, 6019-6028.
- Morel, L., Croker, B. P., Blenman, K. R., Mohan, C., Huang, G., Gilkeson, G. & Wakeland, E. K. (2000).** Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6670-6675.
- Morse, H. C., Iii (1978).** Origins of inbred mice in Proceedings of a Workshop, pp. 3-21. Bethesda, MD: Morse, H.C. III.
- Mott, R., Talbot, C. J., Turri, M. G., Collins, A. C. & Flint, J. (2000).** A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12649-12654.

**Murashima, S., Kumashiro, R., Ide, T., Miyajima, I., Hino, T., Koga, Y., Ishii, K., Ueno, T., Sakisaka, S. & Sata, M. (2000).** Effect of interferon treatment on serum 2',5'-oligoadenylate synthetase levels in hepatitis C-infected patients. *J Med Virol* **62**, 185-190.

**Nadeau, J. H., Singer, J. B., Matin, A. & Lander, E. S. (2000).** Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* **24**, 221-225.

**Nagase, H., Bryson, S., Cordell, H., Kemp, C. J., Fee, F. & Balmain, A. (1995).** Distinct genetic loci control development of benign and malignant skin tumours in mice. *Nat Genet* **10**, 424-429.

**Netea, M. G., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Sprong, T., Verschueren, I., Boerman, O. C., Amiot, F., van den Berg, W. B. & Van der Meer, J. W. (2001).** Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur J Immunol* **31**, 2529-2538.

**Newman, T. L., Tuzun, E., Morrison, V. A., Hayden, K. E., Ventura, M., McGrath, S. D., Rocchi, M. & Eichler, E. E. (2005).** A genome-wide survey of structural variation between human and chimpanzee. *Genome Res* **15**, 1344-1356.

**Nomura, T. (1997).** Practical development of genetically engineered animals as human disease models. *Lab Anim Sci* **47**, 113-117.

**Pan, H., Yan, B. S., Rojas, M., Shebzukhov, Y. V., Zhou, H., Kobzik, L., Higgins, D. E., Daly, M. J., Bloom, B. R. & Kramnik, I. (2005).** *Ipr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* **434**, 767-772.

**Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. (1996).** Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* **184**, 1397-1411.

**Payseur, B. A. & Place, M. (2007).** Prospects for association mapping in classical inbred mouse strains. *Genetics* **175**, 1999-2008.

**Perry, R. D., Pendrak, M. L. & Schuetze, P. (1990).** Identification and Cloning of a Hemin Storage Locus Involved in the Pigmentation Phenotype of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **172**, 5929-5937.

**Perry, R. D. & Fetherston, J. D. (1997).** *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**, 35-66.

**Petkov, P. M., Ding, Y., Cassell, M. A., Zhang, W., Wagner, G., Sargent, E. E., Asquith, S., Crew, V., Johnson, K. A., Robinson, P., Scott, V. E. & Wiles, M. V. (2004).** An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res* **14**, 1806-1811.

**Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Kronke, M. & Mak, T. W. (1993).** Mice deficient for the 55 kd

tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73**, 457-467.

**Pfeffer, K. (2003).** Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 185-191.

**Pouillot, F., Derbise, A., Kukkonen, M., Foulon, J., Korhonen, T. K. & Carniel, E. (2005).** Evaluation of O-antigen inactivation on Pla activity and virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* harbouring the pPla plasmid. *Microbiology* **151**, 3759-3768.

**Quigley, D. & Balmain, A. (2009).** Systems genetics analysis of cancer susceptibility: from mouse models to humans. *Nat Rev Genet* **10**, 651-657.

**Rahalison, L., Vololonirina, E., Ratsitorahina, M. & Chanteau, S. (2000).** Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J Clin Microbiol* **38**, 260-263.

**Ramalingaswami, V. (1995).** Plague in India. *Nat Med* **1**, 1237-1239.

**Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. (2002).** Type iii protein secretion in yersinia species. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 107-133.

**Richer, E., Qureshi, S. T., Vidal, S. M. & Malo, D. (2008).** Chemical mutagenesis: a new strategy against the global threat of infectious diseases. *Mamm Genome* **19**, 309-317.

**Roberts, J. E., Watters, J. W., Ballard, J. D. & Dietrich, W. F. (1998).** Ltx1, a mouse locus that influences the susceptibility of macrophages to cytolysis caused by intoxication with *Bacillus anthracis* lethal factor, maps to chromosome 11. *Mol Microbiol* **29**, 581-591.

**Roberts, L. J., Baldwin, T. M., Curtis, J. M., Handman, E. & Foote, S. J. (1997).** Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. *J Exp Med* **185**, 1705-1710.

**Rogers, J. V., Choi, Y. W., Giannunzio, L. F., Sabourin, P. J., Bornman, D. M., Blosser, E. G. & Sabourin, C. L. (2007).** Transcriptional responses in spleens from mice exposed to *Yersinia pestis* CO92. *Microb Pathog* **43**, 67-77.

**Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M. & Bluethmann, H. (1993).** Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **364**, 798-802.

**Roy, M. F., Lariviere, L., Wilkinson, R., Tam, M., Stevenson, M. M. & Malo, D. (2006).** Incremental expression of Tlr4 correlates with mouse resistance to *Salmonella* infection and fine regulation of relevant immune genes. *Genes Immun* **7**, 372-383.

**Roy, M. F., Riendeau, N., Bedard, C., Helie, P., Min-Oo, G., Turcotte, K., Gros, P., Canonne-Hergaux, F. & Malo, D. (2007).** Pyruvate kinase deficiency confers susceptibility to *Salmonella typhimurium* infection in mice. *J Exp Med* **204**, 2949-2961.

- Sanchez, F., Radaeva, T. V., Nikonenko, B. V., Persson, A. S., Sengul, S., Schalling, M., Schurr, E., Apt, A. S. & Lavebratt, C. (2003).** Multigenic control of disease severity after virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* **71**, 126-131.
- Santos, J., Montagutelli, X., Acevedo, A., Lopez, P., Vaquero, C., Fernandez, M., Arnau, M. R., Szatanik, M., Salido, E., Guenet, J. L. & Fernandez-Piqueras, J. (2002).** A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice. *Oncogene* **21**, 6680-6683.
- Schroder, N. W. & Schumann, R. R. (2005).** Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* **5**, 156-164.
- Sebastiani, G., Olien, L., Gauthier, S., Skamene, E., Morgan, K., Gros, P. & Malo, D. (1998).** Mapping of genetic modulators of natural resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in wild-derived mice. *Genomics* **47**, 180-186.
- Sebbane, F., Gardner, D., Long, D., Gowen, B. B. & Hinnebusch, B. J. (2005).** Kinetics of disease progression and host response in a rat model of bubonic plague. *Am J Pathol* **166**, 1427-1439.
- Sebbane, F., Jarrett, C., Gardner, D., Long, D. & Hinnebusch, B. J. (2009).** The *Yersinia pestis* caf1M1A1 Fimbrial Capsule Operon Promotes Transmission by Flea Bite in a Mouse Model of Bubonic Plague. *Infect Immun* **77**, 1222-1229.
- Secher, T., Vasseur, V., Poisson, D. M., Mitchell, J. A., Cunha, F. Q., Alves-Filho, J. C. & Ryffel, B. (2009).** Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol* **182**, 7855-7864.
- Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T. & Levitz, S. M. (2001).** Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* **166**, 4620-4626.
- Siddiqui, M. R., Meisner, S., Tosh, K., Balakrishnan, K., Ghei, S., Fisher, S. E., Golding, M., Shanker Narayan, N. P., Sitaraman, T., Sengupta, U., Pitchappan, R. & Hill, A. V. (2001).** A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* **27**, 439-441.
- Simond, P. (1898).** La propagation de la peste. *Annales de l'Institut Pasteur* **12**, 625-687.
- Sissons, J., Yan, B. S., Pichugin, A. V., Kirby, A., Daly, M. J. & Kramnik, I. (2009).** Multigenic control of tuberculosis resistance: analysis of a QTL on mouse chromosome 7 and its synergism with *sst1*. *Genes Immun* **10**, 37-46.
- Staelens, J., Wielockx, B., Puimege, L., Van Roy, F., Guenet, J. L. & Libert, C. (2002).** Hyporesponsiveness of SPRET/Ei mice to lethal shock induced by tumor necrosis factor and implications for a TNF-based antitumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9340-9345.
- Stenseth, N. C., Atshabar, B. B., Begon, M., Belmain, S. R., Bertherat, E., Carniel, E., Gage, K. L., Leirs, H. & Rahalison, L. (2008).** Plague: past, present, and future. *PLoS Med* **5**, e3.

- Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F. & Goeddel, D. V. (1993).** Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* **73**, 213-216.
- Tomaso, H., Reisinger, E. C., Al Dahouk, S., Frangoulidis, D., Rakin, A., Landt, O. & Neubauer, H. (2003).** Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**, 117-126.
- Tosh, K., Meisner, S., Siddiqui, M. R., Balakrishnan, K., Ghei, S., Golding, M., Sengupta, U., Pitchappan, R. M. & Hill, A. V. (2002).** A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis* **186**, 1190-1193.
- Tosh, K., Campbell, S. J., Fielding, K., Sillah, J., Bah, B., Gustafson, P., Manneh, K., Lisse, I., Sirugo, G., Bennett, S., Aaby, P., McAdam, K. P., Bah-Sow, O., Lienhardt, C., Kramnik, I. & Hill, A. V. (2006).** Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10364-10368.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Girardin, S. E., Boneca, I. G., Lemos, R., Bozza, M. T., Domingues, R. C., Coyle, A. J., Bertin, J., Philpott, D. J. & Plotkowski, M. C. (2005).** Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **280**, 36714-36718.
- Turcotte, K., Loredó-Osti, J. C., Fortin, P., Schurr, E., Morgan, K. & Gros, P. (2006).** Complex genetic control of susceptibility to *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guerin) infection in wild-derived *Mus spretus* mice. *Genes Immun* **7**, 684-687.
- Turner, J. K., McAllister, M. M., Xu, J. L. & Tapping, R. I. (2008).** Resistance of BALB/cJ mice to *Yersinia pestis* maps to the major histocompatibility complex of chromosome 17. *Infect Immun*.
- Turner, J. K., Xu, J. L. & Tapping, R. I. (2009).** Substrains of 129 mice are resistant to *Yersinia pestis* KIM5: implications for interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **77**, 367-373.
- Turvey, S. E. & Hawn, T. R. (2006).** Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol* **120**, 1-9.
- Une, T. & Brubaker, R. R. (1984).** In Vivo Comparison of Avirulent  $Vwa^-$  and  $Pgm^-$  or  $Pst^+$  Phenotypes of *Yersinia*. *Infect Immun* **43**, 895-900.
- Valdar, W., Flint, J. & Mott, R. (2006).** Simulating the collaborative cross: power of quantitative trait loci detection and mapping resolution in large sets of recombinant inbred strains of mice. *Genetics* **172**, 1783-1797.
- Vanlaere, I., Vanderrijst, A., Guenet, J. L., De Filette, M. & Libert, C. (2008).** Mx1 causes resistance against influenza A viruses in the *Mus spretus*-derived inbred mouse strain SPRET/Ei. *Cytokine* **42**, 62-70.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J. & Ferrero, R. L. (2004).** Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**, 1166-1174.

Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S. & Gros, P. (1995). The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med* **182**, 655-666.

Vogt, G., Chapgier, A., Yang, K., Chuzhanova, N., Feinberg, J., Fieschi, C., Boisson-Dupuis, S., Alcais, A., Filipe-Santos, O., Bustamante, J., de Beaucoudrey, L., Al-Mohsen, I., Al-Hajjar, S., Al-Ghoniaim, A., Adimi, P. *et al.* (2005). Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet* **37**, 692-700.

Vyskocilova, M., Prazanova, G. & Pialek, J. (2009). Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus musculus* strains on proximal chromosome 17. *Mamm Genome* **20**, 83-91.

Wade, C. M., Kulbokas, E. J., 3rd, Kirby, A. W., Zody, M. C., Mullikin, J. C., Lander, E. S., Lindblad-Toh, K. & Daly, M. J. (2002). The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* **420**, 574-578.

Watters, J. W. & Dietrich, W. F. (2001). Genetic, physical, and transcript map of the Ltxs1 region of mouse chromosome 11. *Genomics* **73**, 223-231.

Welch, T. J., Fricke, W. F., McDermott, P. F., White, D. G., Rosso, M. L., Rasko, D. A., Mammel, M. K., Eppinger, M., Rosovitz, M. J., Wagner, D., Rahalison, L., Leclerc, J. E., Hinshaw, J. M., Lindler, L. E., Cebula, T. A., Carniel, E. & Ravel, J. (2007). Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE* **2**, e309.

Welkos, S., Pitt, M. L. M., Martinez, M., Friedlander, A., Vogel, P. & Tammariello, R. (2002). Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of *Yersinia pestis* in non-human primate and mouse models of pneumonic plague. *Vaccine* **20**, 2206-2214.

Whitacre, C. C., Reingold, S. C. & O'Looney, P. A. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science* **283**, 1277-1278.

Wu, D., Zajonc, D. M., Fujio, M., Sullivan, B. A., Kinjo, Y., Kronenberg, M., Wilson, I. A. & Wong, C. H. (2006). Design of natural killer T cell activators: structure and function of a microbial glycosphingolipid bound to mouse CD1d. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3972-3977.

Yakub, I., Lillibridge, K. M., Moran, A., Gonzalez, O. Y., Belmont, J., Gibbs, R. A. & Tweardy, D. J. (2005). Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. *J Infect Dis* **192**, 1741-1748.

Yan, B. S., Kirby, A., Shebzukhov, Y. V., Daly, M. J. & Kramnik, I. (2006). Genetic architecture of tuberculosis resistance in a mouse model of infection. *Genes Immun* **7**, 201-210.

Yang, H., Bell, T. A., Churchill, G. A. & Pardo-Manuel de Villena, F. (2007). On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat Genet* **39**, 1100-1107.

**Zauberman, A., Tidhar, A., Levy, Y., Bar-Haim, E., Halperin, G., Flashner, Y., Cohen, S., Shafferman, A. & Mamroud, E. (2009).** Yersinia pestis endowed with increased cytotoxicity is avirulent in a bubonic plague model and induces rapid protection against pneumonic plague. *PLoS One* **4**, e5938.

**Zhang, J., Wheeler, D. A., Yakub, I., Wei, S., Sood, R., Rowe, W., Liu, P. P., Gibbs, R. A. & Buetow, K. H. (2005).** SNPdetector: a software tool for sensitive and accurate SNP detection. *PLoS Comput Biol* **1**, e53.

**Zhang, Y. & Bliska, J. B. (2005).** Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of Yersinia. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**, 151-173.