

D. MILAN¹, A. ROBIC¹, P. CHARDON²,
N. IANNUCELLI¹, J.-C. CARITEZ³, M. YERLE¹,
J. GELLIN¹, C. LOOFT⁴, L. ANDERSSON⁵,
J.-M. ELSEN⁶, P. LE ROY⁷

¹ INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire,
BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

² INRA-CEA, Laboratoire de Radiobiologie et
d'Etude du Génome, 78352 Jouy-en-Josas cedex

³ INRA, Domaine du Magneraud,
17700 Surgères

⁴ Institute of Animal Breeding and Husbandry,
Christian Albrechts University,
Kiel 24118, Allemagne

⁵ Swedish University of Agricultural Sciences,
Box 7070, SE- 750 07 Uppsala, Suède

⁶ INRA, Station d'Amélioration Génétique des
Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

⁷ INRA, Station de Génétique Quantitative et
Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas cedex

e-mail : Denis.Milan@toulouse.inra.fr

4 - Recherche de gènes associés à des fonctions

Exemple de cartographie fine : le cas du gène RN chez le porc

Résumé. En 1986, un gène majeur ayant un effet défavorable sur le rendement à la cuisson de la viande de porc a été mis en évidence. La constitution de familles informatives nous a permis de cartographier ce gène appelé RN sur le chromosome 15. Pour identifier le gène RN, nous avons successivement réalisé : la cartographie génétique fine de RN, la cartographie cytogénétique de marqueurs proches, des études de carte comparée, le développement de cartes d'irradiation de la région de RN chez le porc et chez l'Homme, le développement d'un contig de BAC couvrant près de 2 Mb, le développement d'une carte du déséquilibre de liaison de la région de RN chez le porc, le séquençage d'un BAC contenant le gène RN, l'identification d'un gène encore inconnu membre d'une famille de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose/glycogène, l'identification d'une mutation causale dans la séquence codante de ce gène.

En 1985, un travail mené sur l'étude des «viandes acides» montrait que les animaux atteints présentaient une augmentation de la quantité de glycogène musculaire, induisant une diminution du rendement technologique à la cuisson. Ce syndrome fut appelé « effet Hampshire » car il était caractéristique de cette race américaine (Monin et Sellier, 1985). Confronté à ce problème dans les lignées de la firme de sélection Pen ar Lan, Naveau (1986) suggérait, pour expliquer ce défaut, l'existence d'un gène majeur, qu'il nomma «RN». Depuis lors, les travaux menés à l'INRA ont permis : de confirmer l'existence de ce gène majeur, de montrer que l'effet de l'allèle défavorable RN- sur le rendement à la cuisson était bien équivalent à « l'effet Hampshire » et, enfin, de montrer que le génotype RN affecte la plupart des caractères de qualité de la viande (jutosité, moelleux, tendreté ...), ainsi que l'adiposité des animaux (Le Roy *et al* 1996).

Pour identifier le gène RN, la première approche a été de tester l'implication de 4 enzymes clés du métabolisme du glycogène. Cette étude de gènes candidats s'est avérée infructueuse (Estrade 1994). Parallèlement, le développement de nombreux marqueurs génétiques et la production de cartes couvrant le génome du porc permettaient d'envisager la cartographie du gène RN. Des familles informatives ont donc été produites au domaine INRA du

Magneraud en croisant des animaux hétérozygotes RN⁻/rn⁺ à des animaux homozygotes pour l'allèle récessif rn⁺/rn⁺. Deux cents descendants pour lesquels le génotype RN pouvait être déterminé avec une probabilité d'au moins 90 %, ont été identifiés à partir de la mesure du Rendement Technologique Napole (RTN), caractère sur lequel Naveau (1986) avait démontré l'existence du gène. L'analyse de marqueurs génétiques sur ces animaux permit de montrer une liaison génétique significative entre le gène RN et un marqueur situé sur le chromosome 15 du porc à une distance de 18 cM de RN (Milan *et al* 1995). Les travaux de cartographie fine du gène RN pouvaient commencer.

1 / Cartographie génétique de la région de RN

Afin de préciser la position du gène RN, nous avons cartographié sur les familles RN l'ensemble des marqueurs disponibles dans la région identifiée. Nous avons aussi génotypé 450 animaux complémentaires pour lesquels l'estimation du génotype RN était basée sur la mesure du potentiel glycolytique musculaire. Ces travaux nous ont permis de montrer que RN se trouvait dans un intervalle de 7 cM, le marqueur le plus proche, Sw936, étant situé à moins de 2 cM de RN (Milan *et al* 1996).

2 / Cartographie cytogénétique fine et cartographie comparée

L'étape suivante consistait à déterminer la position de RN sur le chromosome 15. Pour cela, un YAC contenant le marqueur Sw936 a été isolé à partir de la banque produite au laboratoire de radiobiologie et étude du génome (INRA-CEA, Jouy-en-Josas). Le YAC ainsi isolé a été cartographié par hybridation *in situ* FISH sur la bande 15q25. Cette bande étant orthologue d'une région du chromosome 2 humain, nous avons cherché à produire de nouveaux marqueurs à partir des gènes situés sur ce chromosome humain. Nous avons ainsi pu développer un marqueur génétique du gène TNP1 et montrer que ce gène était situé entre les deux marqueurs génétiques flanquant RN. Parallèlement, nous avons cartographié chez le porc ou chez l'Homme trois candidats susceptibles d'expliquer les différences observées sur les animaux : UGP2 cartographié grossièrement sur le chromosome 2 humain, PPP1R3 et glycogénine non cartographiés chez l'Homme. L'implication de ces trois candidats a ainsi pu être écartée.

Les travaux ultérieurs ont été menés en collaboration entre l'INRA et deux équipes européennes travaillant sur ce même sujet en Suède (Uppsala - Leif Andersson) et en Allemagne (Kiel - Christian Looft).

3 / Cartographie physique de la région de RN

La cartographie de marqueurs sur les familles RN nécessite bien évidemment d'identifier un polymorphisme pour le gène à cartographier et de disposer de parents hétérozygotes pour RN et le marqueur en question. Pour contourner cette difficulté, nous avons choisi d'utiliser le panel d'hybrides d'irradiation développé au laboratoire de génétique cellulaire (INRA Toulouse ; voir l'article de Yerle 2000, cet ouvrage). Tout fragment porcin peut en effet être cartographié sur ce panel d'hybrides, si aucun fragment (ou un fragment différent) n'est amplifié à partir de l'ADN hamster présent dans tous les hybrides. Neuf gènes différents situés chez l'Homme autour de TNP1 (dont le gène TNP1) ont ainsi été cartographiés sur le panel d'hybrides d'irradiation. Nous avons pu alors montrer qu'autour de RN, l'ordre des gènes était le même chez l'Homme et le porc (Robic *et al* 1999). Les données de la carte humaine pouvaient donc être utilisées pour générer des marqueurs proches de RN, et fournir d'éventuels candidats.

Parallèlement à ce travail, nous avons cloné toute la région contenant le gène RN : 1) des BAC ont été identifiés à partir des différents marqueurs proches de RN, 2) les extrémités de ces BAC ont été séquencées pour développer des marqueurs d'extrémité, 3) de nouveaux BAC ont été isolés à partir de ces nouveaux marqueurs. Cette démarche itérative a permis de cloner la région de RN dans un contig constitué de plus de 70 BAC et couvrant près de 2 Mb. Sept marqueurs microsatellites ont également été isolés à partir de ces BAC pour densifier la carte génétique.

Nous avons enfin souhaité ordonner tous les gènes connus dans la région de RN chez l'Homme.

Les marqueurs disponibles ont été cartographiés sur le panel d'hybrides d'irradiation à haute définition TNG, présentant une résolution de l'ordre de 50 kb. Nous avons ainsi produit une carte à haute définition comprenant 22 microsatellites, 12 marqueurs anonymes et 79 marqueurs de gènes (identifiés ou putatifs). Ce travail ne nous a pas permis de découvrir de candidat à la position attendue, mais il a permis de confirmer que l'ordre des gènes est similaire chez le porc et chez l'Homme, et de préciser l'environnement génétique du gène RN.

4 / Cartographie génétique fine de la région de RN

En regroupant les pedigrees français, suédois et allemands, nous disposons de plus de 1000 méioses informatives pour RN. Ces grandes familles nous ont permis de construire une carte génétique très fine des points de recombinaison au voisinage de RN. Vingt-quatre animaux présentant une recombinaison proche de RN ont été étudiés en détail avec plus de 15 marqueurs génétiques situés dans le contig de BAC et couvrant un intervalle de 2 cM. L'analyse de ces données ne permettant pas de conclure d'une manière non ambiguë, ces marqueurs ont été analysés sur 68 verrats Hampshire suédois de phénotype RN connu. Cette expérience nous a permis de détecter une zone, à l'intérieur du contig de BAC, en très fort déséquilibre de liaison avec RN.

5 / Identification d'un candidat positionnel

Le BAC contenant les marqueurs en déséquilibre de liaison total a été séquencé au Genome Center de Stockholm. Ce séquençage nous a permis d'identifier la présence d'un gène encore inconnu dans les différentes espèces de mammifères, mais présentant des homologies avec les membres d'une famille de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et du glycogène. Par ailleurs, nous avons montré que ce gène était spécifiquement exprimé dans le muscle, chez l'Homme et chez le porc. Une mutation, susceptible d'expliquer les différences entre RN⁻ et rn⁺, a été trouvée dans la séquence codante. Parmi les animaux analysés jusqu'à présent, cette mutation est totalement et exclusivement rencontrée en association avec RN⁻, elle peut être considérée comme mutation candidate.

Conclusion

Le gène RN a donc été identifié par une démarche que l'on peut qualifier de clonage positionnel strict (Milan *et al* 2000), puisque le gène identifié n'était pas connu jusqu'à présent. C'est à notre connaissance le premier exemple de succès d'une démarche de clonage positionnel strict chez les animaux d'intérêt zootechnique. L'identification du gène va faciliter l'éradication de l'allèle RN⁻ lorsque celle-ci est souhaitée. La connaissance du gène va également nous permettre de rechercher d'éventuelles mutations dans d'autres populations porcines, et de tester le polymorphisme de ce gène dans d'autres espèces. Cette découverte pourrait en particulier s'avérer très importante en médecine humaine.

Références

- Estrade M., 1994. Etude de l'expression métabolique du gène RN⁺. Thèse de doctorat de l'Université Blaise Pascal (Université d'Auvergne), n°605.
- Le Roy P., Monin G., Elsen J.M., Caritez J.C., Talmant A., Lebreton B., Lefaucheur L., Mourot J., Juin H., Sellier P., 1996. Effect of the RN genotype on growth and carcass traits in pigs. 47ème réunion annuelle de la FEZ, 26-29 août 1996, Lillehammer, Norvège.
- Milan D., Le Roy P., Woloszyn N., Caritez J.C., Elsen J.M., Sellier P., Gellin J., 1995. The RN locus for meat quality maps to Pig chromosome 15. *Genet. Sel. Evol.*, 27, 195-199.
- Milan D., Woloszyn N., Yerle M., Le Roy P., Bonnet M., Riquet J., Lahbib-Mansais Y., Caritez J.C., Robic A., Sellier P., Elsen J.M., Gellin J., 1996. Accurate mapping of the «acid meat» RN gene on genetic and physical maps of pig chromosome. *Mammalian Genome*, 7, 47-51.
- Milan D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundström K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Le Roy P., Chardon P., Andersson L., 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288, 1248-1251.
- Monin G., Sellier P., 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post mortem period: the case of the Hampshire breed. *Meat Science*, 13, 49-63.
- Naveau J., 1986. Contribution à l'étude du déterminisme génétique de la qualité de la viande porcine. Héritabilité du rendement technologique Napole. *Journées Rech. Porcine en France*, 18, 265-276.
- Robic A., Seroude V., Jeon J.T., Yerle M., Wasungu L., Andersson L., Gellin J., Milan D., 1999. A radiation hybrid map of the RN region in pigs demonstrates conserved gene order compared with the human and mouse genomes. *Mammalian Genome*, 10, 565-568.
- Yerle M., 2000. Etablissement des cartes cytogénétiques et physiques. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 87-93.

