

4 - Recherche de gènes associés à des fonctions

Exemple d'approche fonctionnelle : le gras intramusculaire chez le porc

C. RENARD¹, J. MOUROT²

¹ INRA-CEA, Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome,
78352 Jouy-en-Josas cedex

² INRA, Unité Mixte de Recherche sur le Veau et le Porc,
35590 Saint-Gilles

e-mail : Christine.Renard@biotec.jouy.inra.fr

Résumé. Nous avons utilisé alternativement les techniques d'analyse fonctionnelle, d'analyse génétique et de biologie moléculaire pour identifier les gènes qui ont un effet majeur sur le gras intramusculaire du porc indépendamment de ceux qui agissent sur l'épaisseur de du gras sous-cutané dorsal. L'ensemble des travaux met en évidence : l'influence prépondérante de la région péri-centromérique du chromosome 7, marquée par le complexe majeur d'histocompatibilité SLA, sur le taux de lipides intramusculaires ; le rôle clef de l'enzyme malique, une des enzymes de la lipogenèse, dans la synthèse lipidique intramusculaire tout au long du développement corporel du porc ; l'existence d'un gène proche de SLA, qui contrôle l'activité de cette enzyme et dont le profil est le suivant : ce n'est pas le gène codant pour l'enzyme malique, celui-ci étant localisé sur le chromosome 1, il n'agirait pas par activation de la transcription de la protéine, mais il pourrait intervenir sur le nombre, la différenciation, l'activation ou la migration des adipocytes dans les muscles.

Après trente années de sélection particulièrement efficace contre l'adiposité des carcasses de porc, il est devenu nécessaire de préserver une quantité suffisante de lipides au sein des muscles sans augmenter la couche de tissu gras sous-cutané, afin d'améliorer la qualité organoleptique de viande. Notre contribution à cette nouvelle orientation de la sélection porcine a consisté à approfondir nos connaissances du métabolisme lipidique dans ces deux types tissulaires pour mieux les mettre en parallèle avec les différences de contrôles génétiques observés.

1 / Associations entre marqueurs génétiques et performances d'adiposité

Il existe une association génétique entre le complexe majeur d'histocompatibilité SLA et la teneur en tissus gras des carcasses à l'abattoir. SLA est un complexe génétique très polymorphe, dont les allèles de quelques loci sont identifiés par un test simple de lymphocytotoxicité disponible depuis de nombreuses années. C'est un excellent marqueur génétique pour la région centromérique du chromosome 7 où il est localisé (Geffrotin *et al* 1984, Rabin *et al* 1985). L'effet de la région SLA sur les paramètres de l'adiposité des carcasses a été observé en race Large White et Landrace en France (Renard *et al* 1988), et en race Piétrain et Landrace en Belgique. Plus récemment, cette association a été confirmée dans plusieurs troupeaux aux USA et en Europe (Bidanel *et al* 2000). Les marqueurs utilisés étaient alors des microsatellites couvrant l'ensemble

du génome et pas seulement la région SLA. À cette occasion, d'autres régions chromosomiques impliquées dans le métabolisme lipidique ont été mises en évidence. Elles sont localisées notamment sur les chromosomes 4, 2 et X, mais elles agissent plutôt sur l'épaisseur du gras sous-cutané dorsal tandis que la zone SLA intervient essentiellement dans le muscle avec, selon les populations, un effet plus ou moins marqué sur l'épaisseur de gras sous-cutané dorsal.

L'ensemble des résultats suggère qu'il est possible d'accroître la teneur en lipides des muscles sans augmenter l'épaisseur de gras sous-cutané dorsal, puisque ces caractères ne sont pas toujours contrôlés par les mêmes régions du génome. Ceci est réalisable à condition de bien identifier le rôle de chaque région candidate sur des facteurs plus élémentaires que l'adiposité globale d'un tissu, facteurs qui seraient limitants dans une population mais pas dans l'autre.

2 / Décomposition du phénotype « adiposité » : importance de l'activité de l'enzyme malique

2.1 / Choix de facteurs à mesurer

Dans un premier temps, les mesures d'adiposité, trop globales, ont été complétées par des mesures de facteurs connus pour jouer un rôle important dans le métabolisme lipidique des tissus adipeux musculaire et sous-cutané. La lipolyse étant peu

importante chez le porc, l'étude a commencé par le dosage d'activité d'enzymes de la lipogenèse :

- l'acétyl-coenzyme A, parce qu'elle intervient dans la réaction d'allongement des chaînes d'acide gras ;

- l'enzyme malique, parce que son activité a pour conséquence de réduire la coenzyme NADP sous la forme NADPH indispensable à l'allongement des chaînes d'acide gras. Dans le muscle, elle devient la principale source de NADPH au cours du développement corporel du porc. Dans le gras sous-cutané dorsal, elle partage cette contribution avec l'enzyme suivante ;

- la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), en tant que co-fournisseur de NADPH dans le tissu adipeux sous-cutané dorsal. Elle a une activité nulle dans le muscle au moment de l'abattage (Mourot *et al* 1995).

2.2 / Choix de familles de porc informatives à tester selon deux types de critères

Allèles du marqueur SLA associés aux phénotypes adipeux extrêmes

Les dosages lipidiques et enzymatiques ont été testés, en plus des mesures classiques réalisées à l'abattoir, sur 7 familles issues de croisements entre des femelles Large White et des mâles Landrace. Les reproducteurs ont été choisis pour suivre la ségrégation de trois des allèles SLA ayant des effets significatifs extrêmes sur l'adiposité d'après les résultats obtenus sur les porcs non apparentés des deux races d'origine. Les résultats ont montré l'effet prédominant des gènes de la région SLA sur l'activité de l'enzyme malique et la quantité de lipides intramusculaires ($P < 0,0001$). Dans le gras dorsal, l'effet de la région SLA sur l'activité de l'enzyme malique et de l'acétyl-coA n'est significatif qu'à $P < 0,05$ et $P < 0,02$, et aucune influence sur l'épaisseur de gras sous-cutané dorsal n'est significative dans cette population de porcs (Renard *et al* 1992 et 1996). Le SLA était le seul marqueur génétique testé. Quelques microsatellites localisés autour de SLA ont été testés par la suite, mais ils n'ont apporté aucun résultat significatif supplémentaire.

Phénotypes « Maigre/ Adipeux » dans la génération F2 du croisement de races différentes

Les mêmes mesures ont été réalisées sur une partie du troupeau PiGMaP-QTL produit au domaine INRA du Magneraud (17), issu de deux races aux performances adipeuses extrêmes : Meishan (MS), race chinoise caractérisée par une forte adiposité et Large White (LW), fortement sélectionnée avec succès pour une faible épaisseur de gras dorsal. Dans cette population, l'aspect génétique a été mieux couvert par le test des nombreux microsatellites répartis sur le génome et autour de SLA et par l'utilisation des techniques d'analyse multipoints (Bidanel *et al* 2000). Les résultats confirment l'effet prépondérant d'un gène localisé près de SLA sur le taux de lipides intramusculaires et sur le niveau d'activité de l'enzyme malique dans le muscle long dorsal. L'effet de la région est plus faible sur l'épaisseur de gras sous-cutané dorsal et inversé par rapport à ce qu'on attend des allèles provenant de la race MS.

3 / Exclusion du gène candidat « enzyme malique cytosolique »

Dans l'hypothèse où les différences d'activité de l'enzyme provenaient de variations du gène de structure ou de la région promotrice du gène, le gène de l'enzyme malique cytosolique était important à localiser par rapport au SLA. C'était un bon gène candidat car il était décrit comme proche du complexe d'histocompatibilité dans plusieurs espèces de mammifères. Nous avons extrait l'ARN d'un muscle très actif, cloné, séquencé l'ADNc, et localisé le gène sur le chromosome 1 (Nunes *et al* 1996) alors que SLA est situé sur le chromosome 7. L'effet associé à la région SLA ne provient donc pas d'une variation dans le gène de l'enzyme malique.

4 / Étude du niveau d'intervention du gène régulateur de l'activité de l'enzyme malique et de son profil

À côté de l'étude génétique entreprise pour répertorier les gènes de la région et restreindre cette région impliquée par la recherche de nouveaux marqueurs microsatellites, une étude *in vivo* et *in vitro* a été menée pour définir le profil du QTL de la région SLA qui interviendrait sur le gras intramusculaire via l'activité de l'enzyme malique ou, plus généralement, via la multiplication, la migration ou la différenciation des adipocytes. Ce travail a permis de comparer les deux races fondatrices du troupeau PigMap-QTL en attendant d'autres animaux génétiquement informatifs. La mise en place du tissu adipeux au cours du développement corporel de l'animal a été étudiée dans trois tissus : un tissu gras externe (gras dorsal), un muscle « gras » (le diaphragme) et un muscle « maigre » (le semimembraneux), à trois stades de la vie de l'animal dans chacune des races. *In vivo*, l'étude a porté sur des extraits d'homogénats tissulaires : dosage des lipides et des activités enzymatiques, évaluation des transcrits de l'enzyme malique par Northern blots. Les résultats mettent en évidence une activité de l'enzyme malique supérieure chez les porcs MS comparés aux porcs LW alors que le signal des transcrits est inférieur. De plus, aucune corrélation n'existe entre la quantité de transcrit et l'activité enzymatique à chaque stade de développement corporel, bien que les différences individuelles soient plus faibles aux stades précoces.

Ces résultats excluent les différences de stimulation de la transcription comme causes des différences d'activité enzymatique entre ces deux races. *In vitro*, les techniques d'isolement et de culture primaire des adipocytes ont été appliquées sur les tissus externes (tissu sous-cutané du dos comparé à celui du cou) et sur des tissus adipeux intramusculaire et intermusculaire. Ce travail a permis de mesurer le diamètre moyen des adipocytes isolés, leur vitesse de multiplication, leur capacité de synthèse des lipides et le niveau d'activité des enzymes lipogéniques (Mourot *et al* 1996).

La mise en place des adipocytes est plus précoce dans les tissus gras externes que dans le tissu gras intramusculaire et elle a lieu plus tôt chez les porcs MS que chez les porcs LW. La vitesse de multiplication des adipocytes est plus grande chez les porcs

MS que chez les porcs LW, mais leur nombre par gramme de tissu est plus faible en raison de leur contenu en lipides et de leur plus grand diamètre. Quand on compare l'activité de synthèse lipidique des adipocytes qui ont le même diamètre, elle est supérieure chez les porcs MS aux stades précoces. En revanche, dans le tissu gras externe, les adipocytes vieillissent plus rapidement chez les porcs MS en atteignant un diamètre à partir duquel l'activité de synthèse lipidique diminue, ne laissant place qu'à l'activité de stockage (Mourot *et al* 1999). Il sera important de relier ces différences fonctionnelles avec les résultats obtenus par la recherche de QTL pour mieux comprendre pourquoi l'allèle d'origine MS entraîne une plus forte quantité de lipides intramusculaires et une plus faible épaisseur de gras dorsal chez les porcs issus de croisement entre ces deux races à la génération F2.

5 / Gènes candidats dans la région SLA

Nombreux sont les gènes de la région que nous sommes en train de mettre en évidence à l'aide de la banque d'ADN génomique dans des BACs. Beaucoup sont des gènes de facteurs de transcription. On a identifié également un gène codant pour une protéine de la matrice extracellulaire, un régulateur de l'AMP cyclique et du cycle cellulaire. Actuellement, les meilleurs candidats, sont les suivants :

- *RXR β* (Retinoid X Receptor), facteur de transcription intervenant sur les promoteurs de nombreux gènes d'enzymes de la lipogénèse et d'activation des adipocytes ;
- *TNF α* (Tumor Necrosis Factor alpha), facteur

intervenant sur de nombreuses fonctions dont la régulation de la sensibilité des adipocytes à l'insuline.

Nous essayons d'enrichir la région en microsatellites pour réduire la taille de la région candidate et, par conséquent, le nombre de gènes possibles.

Conclusion

L'approche fonctionnelle a permis de déceler le facteur "activité de l'enzyme malique" comme l'élément important de l'adiposité intramusculaire qui contribue à l'association génétique entre la région centromérique du chromosome 7 et l'adiposité intramusculaire. En revanche, les comparaisons entre races ayant des caractéristiques adipeuses différentes ne permettent pas encore de définir le profil du ou des gène(s) modulant l'activité de l'enzyme malique et différenciant les races Meishan et Large White. Les résultats obtenus excluent la régulation de la transcription de l'enzyme malique comme facteur important. Cependant, ils montrent que ces deux races diffèrent essentiellement par le nombre, la mise en place et le vieillissement des adipocytes dans les tissus adipeux au cours du développement corporel. Le profil du gène candidat est encore vague et correspond à des observations faites sur des porcs de race pure uniquement. Une analyse des ARN messagers et des métabolites intermédiaires à partir des cultures primaires d'adipocytes permettra de mieux « profiler » les gènes. L'application de ces techniques sur des porcs provenant de familles génétiquement informatives (F2 ou backcross Meishan x Large White) permettrait d'observer les paramètres adipocytaires qui restent transmis ensemble et ceux qui sont liés aux marqueurs génétiques repérés.

Références

- Bidanel J.P., Milan D., Iannuccelli N., Amigues Y., Boscher M.Y., Bourgeois F., Caritez J.C., Gruand J., Le Roy P., Lagant H., Bonneau M., Lefaucheur L., Mourot J., Prunier A., Désautés C., Mormède P., Renard C., Vaiman M., Robic A., Gellin J., Ollivier L., Chevalet C., 2000. Détection de locus à effet quantitatifs dans le croisement entre les races porcines Large White et Meishan : résultats et perspectives. Journées de la Recherche Porcine en France, 32, 369-383.
- Geffrotin C., Popescu C.P., Cribiu E.P., Boscher J., Renard C., Chardon P., Vaiman M., 1984. Assignment of MHC in swine to chromosome 7 by hybridization and serological typing. Ann. Génét., 27, 213-219.
- Mourot J., Kouba M., 1999. Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs. Reprod. Nutr. Dev., 39, 125-32
- Mourot J., Kouba M., Peiniau P., 1995. Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing domestic pig (*Sus domesticus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 111B, 379-384.
- Mourot J., Kouba M., Bonneau M., 1996. Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing Meishan pig : comparison with the Large White pig (*Sus domesticus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 115B, 383-388.
- Nunes M., Lahbib-Mansais G., Geffrotin C., Yerle M., Vaiman M., Renard C., 1996. Swine cytosolic malic enzyme: cDNA cloning, sequencing, and localisation. Mammalian Genome, 7, 815-821.
- Rabin M., Fries R., Singer D.S., Ruddie F.H., 1985. Assignment of the porcine major histocompatibility complex to chromosome 7 by in situ hybridization cytogen. Cell. Genet., 39, 206-209.
- Renard C., Bidanel J.P., Palovics A., Vaiman M., Guérin G., Runavot J.P., 1988. Relation entre des marqueurs génétiques et les caractères de production chez le porc. Journées de la Recherche Porcine en France, 20, 315-320.
- Renard C., Mourot J., Götz K., Caritez J.C., Bidanel J.P., Vaiman M., 1992. Analyse des liaisons génétiques entre les marqueurs SLA et les caractères de croissance et d'adiposité chez le porc. Journées de la Recherche Porcine en France, 24, 9-17.
- Renard C., Mourot J., Nunes M., Lahbib-Mansais Y., Geffrotin C., Bourgeois N., Caritez J.C., Götz K., Bidanel J.P., Vaiman M., 1996. Association between the swine MHC region and malic enzyme activity in muscle., Proceedings of the 25th ISAG Conference, Tours 21-25 July 1996, France. Animal Genetics, 27 (Suppl. 2), E061, 115-116.