

J. GELLIN et H. LEVÉZIEL *

INRA Laboratoire de Génétique cellulaire BP 27
31326 Castanet-Tolosan Cedex

*INRA Laboratoire de Génétique biochimique
78352 Jouy-en-Josas Cedex

**Apports actuels et futurs des
marqueurs génétiques dans
l'amélioration des populations
animales**

**Stratégie d'établissement
des cartes géniques des
espèces d'élevage**

Résumé. Au sein des différents pays impliqués dans les programmes de la CEE (BRIDGE et BIOTECH), la structure de recherche française est sans doute à l'heure actuelle, par le nombre de chercheurs, par l'ensemble des secteurs méthodologiques couverts, et par l'ensemble des soutiens dont elle dispose au niveau du Département de Génétique Animale, le regroupement le plus important travaillant sur la cartographie génique des porcs et des bovins.

L'activité essentielle de cartographie chez les porcins et les bovins sera de définir, le long du génome, un certain nombre "d'étiquettes" (des microsattellites) permettant d'établir un premier réseau de marques génétiques espacées de 20 cM dont certains seront localisés précisément sur les chromosomes. Cette connaissance recueillie sur le génome sera intégrée aux analyses quantitatives actuelles grâce la mise en oeuvre de nouveaux concepts d'analyse génétique (programme INRA : PRODIGE-MMM). Elle permettra une évolution précoce des génotypes, une amélioration des méthodes d'identification des animaux et de vérification des filiations, la mise en évidence de régions du génome intervenant dans la variabilité de caractères quantitatifs (QTL), une appréciation de la diversité génétique des races. Les connaissances obtenues seront également utiles à la compréhension de certains aspects du génome humain, notamment le séquençage de cDNAs et la recherche de "QTL" difficile à étudier directement chez l'homme.

Le renouvellement et l'amélioration des méthodes de la sélection animale sont des besoins ressentis de longue date. Les progrès de la cartographie génique offriront la possibilité d'utiliser dans les programmes de sélection dans un délai de 3 à 4 ans une information recueillie sur le génome et, de fait, permettront d'avoir accès à la connaissance des gènes impliqués dans le déterminisme de caractères quantitatifs d'intérêt zootechnique.

Les cartes géniques chez les animaux sont aujourd'hui très rudimentaires en dehors des primates et de la souris. Chez les animaux domestiques, on constate que certains chromosomes sont encore dépourvus de tout marqueur (voir exemple de la carte du porc, figure 1). Ces données montrent parfaitement le chemin à parcourir.

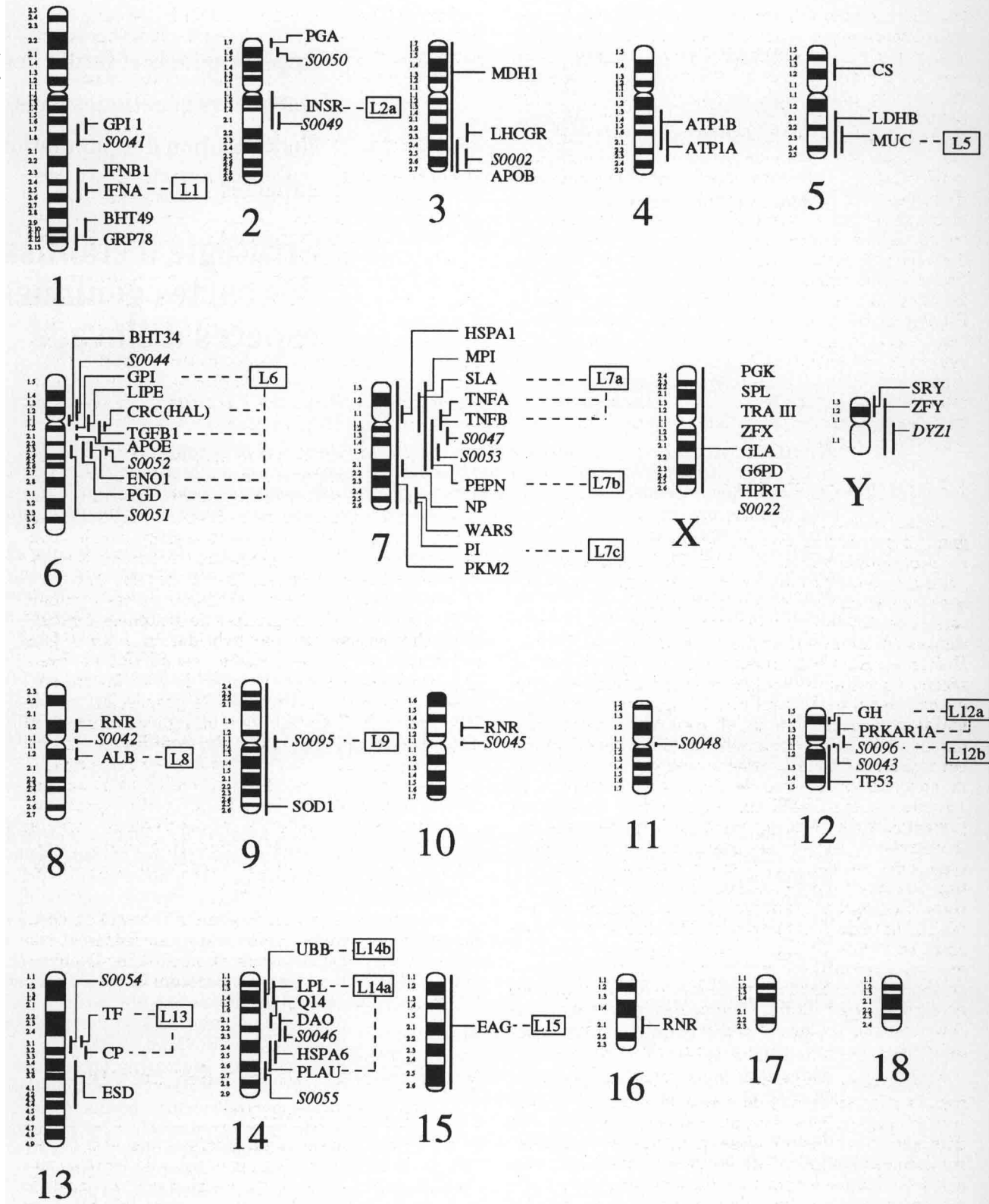
Cette situation provient de ce que le nombre d'équipes engagées dans une telle thématique était jusqu'à présent très réduit et qu'aucune action coordonnée n'avait été entreprise. Grâce à la prise de conscience de l'importance des cartes géniques en sélection animale, le contexte a changé très rapidement et de nombreuses équipes (Pays d'Europe, USA, Australie, Nouvelle-Zélande) s'engagent avec de gros moyens sur ce thème chez les animaux d'élevage. Ainsi, la situation jusque là très figée est maintenant dans une phase de vive évolution. La carte génique humaine, compte tenu de son très grand état d'avancement, constitue une référence fondamentale, per-

met l'exploitation d'un champ énorme de connaissance, et donne une idée des moyens techniques et financiers nécessaires pour une entreprise équivalente chez les animaux. Dans le domaine de la carte génétique des espèces d'élevage, l'INRA s'engage fermement. Actuellement les unités concernées du Département de Génétique Animale bénéficient d'un renforcement conséquent de moyens en personnel et en équipement et ont une position de leader sur le plan international au sein des programmes PigMap (BRIDGE) et BovMap (BIOTECH). Le choix s'est porté sur deux espèces parmi les plus importantes : les porcs et les bovins. On sait toutefois que les homologues sont telles entre bovins, ovins et caprins, que les données acquises chez les premiers seront aisément transposables aux deux autres espèces. Ce choix laisse de côté, pour le moment, une espèce économiquement importante, la poule.

1 / Les deux groupes de travail : PigMap - BovMap

Les objectifs de cartographie génétique du Département de Génétique Animale de l'INRA sont ambitieux. Pour aboutir, les moyens déjà disponibles ont été largement renforcés, les différentes équipes concernées ont développé des collaborations entre elles et ont oeuvré pour acquérir une position impor-

Figure 1.
Carte
génétique du
porc
(Laboratoire
de Génétique
cellulaire,
20/10/92).



Les chromosomes sont représentés schématiquement et les gènes par le nom abrégé de leur locus. Les segments d'ADN et les marqueurs de type microsatellites sont notés en italique.

Les indications entourées d'un rectangle (L pour Linkage) correspondent à des groupes de marqueurs liés génétiquement deux à deux (Lod Score >3).

L'un des marqueurs du groupe est localisé physiquement et situe l'ensemble sur le génome

tante sur le plan international. Au niveau de la communauté européenne elles se sont intégrées aux programmes BRIDGE et BIOTECH. Les équipes concernées à Jouy-en-Josas et à Toulouse avaient déjà une expérience approfondie de l'analyse du génome et maîtrisent l'ensemble des techniques et outils nécessaires à l'élaboration des cartes génétiques. De plus, sur chacun des deux sites, les travaux de génétique moléculaire et cellulaire bénéficient de l'expérience d'équipes spécialisées en génétique quantitative qui apportent leur contribution dans le traitement conceptuel et informatique des données recueillies dans les populations. Cet ensemble intégré de compétences scientifiques représente un potentiel d'environ 20 chercheurs pour l'ensemble des programmes PigMap et BovMap. De plus, l'INRA dispose de stations expérimentales lui permettant de mettre en oeuvre des programmes de croisements ambitieux. La disponibilité de tels troupeaux a peu d'équivalent ailleurs. Pour les bovins, on peut compter sur le soutien des organismes professionnels pour accéder facilement aux animaux des élevages privés.

1.1 / Le groupe PigMap

Actuellement l'équipe française de cartographie du génome porcin poursuit ses recherches dans le cadre du programme européen BRIDGE, PigMap. Ce programme, dont la coordination administrative est assurée par une équipe anglaise (AFRC), regroupe au total une dizaine de laboratoires européens et nordiques (Allemagne, Angleterre, Belgique, France, Hollande, Norvège, Suède) avec un élargissement récent à des équipes américaines et australiennes qui en ont exprimé le souhait. Ce groupe fonctionne maintenant depuis un an, et avec un succès reconnu par la CEE. Le Département de Génétique Animale est représenté dans ce programme par une douzaine de chercheurs. L'unité de Génétique Cellulaire de Toulouse assure, avec une équipe de 7 chercheurs permanents, le développement de la carte génétique (recherche et analyse des marqueurs microsatellites, typage des animaux) et de la carte physique (localisation des gènes par hybridation *in situ* à l'aide du tritium, fluorescence, analyse de cartographie comparée). L'unité de Cytométrie du CEA de Fontenay-aux-roses et l'unité de Radiobiologie appliquée de Jouy-en-Josas travaillent sur le tri de chromosomes et l'élaboration de banques de sondes d'ADN spécifiques de chromosomes. Enfin, l'équipe de Cytogénétique de Jouy-en-Josas assure le contrôle des caryotypes des animaux engagés dans les programmes d'élevage.

Les typages génétiques ainsi effectués nécessiteront la mise en oeuvre de nouvelles méthodes d'analyse génétique. Des concepts nouveaux permettront d'intégrer dans les analyses quantitatives actuelles, les données obtenues sur les gènes eux-mêmes afin d'utiliser judicieusement les liaisons observées entre marqueurs et caractères de production. Pour cela les unités de cartographie sont associées avec des unités de Génétique Quantitative et Mathématique, elles-mêmes coordonnées au sein d'un programme INRA, PRODIGE MMM : Méthodologie des Marqueurs Moléculaires (stations de Génétique Quantitative et Appliquée de Jouy-en-Josas, Biomathématique et station d'Amélioration des Animaux de Toulouse, ainsi que les stations de Biométrie de Jouy-en-Josas et de Toulouse).

Au sein des différents pays impliqués dans ce programme BRIDGE de la CEE, la structure de

recherche française, ci-dessus définie, est sans doute, à l'heure actuelle, par le nombre de chercheurs et par l'ensemble des secteurs méthodologiques couverts, le groupe le plus important travaillant sur la cartographie du porc.

1.2 / Le groupe BovMap

Actuellement, l'équipe française de cartographie du génome bovin développe ses recherches dans la perspective de la mise en place, dans un cadre européen, du programme BIOTECH, BovMap. Elle assurera la coordination administrative de ce programme qui regroupe une trentaine de laboratoires situés dans treize pays européens et nordiques. Des contacts ont d'ores et déjà été établis avec les équipes israéliennes qui souhaitent s'intégrer dans ce programme. Le groupe a répondu à l'appel d'offre CEE BIOTECH pour obtenir le soutien financier de la Communauté Européenne, et bénéficie à cet égard du succès du programme BRIDGE PigMap.

Le Département de Génétique Animale est représenté dans ce programme par une douzaine de chercheurs. Les laboratoires de Génétique Biochimique et de Cytogénétique de Jouy-en-Josas assurent, avec un potentiel global de 7 chercheurs permanents, le développement de la carte génétique (recherche, analyse de marqueurs microsatellites, typages des animaux) et le développement des techniques de cartographie physique (recherche de groupes de synténies, localisations chromosomiques par hybridation *in situ*). Une collaboration a été développée avec l'INRA de Tours et le CEA Fontenay pour tenter de trier les chromosomes bovins en profitant de la possession, par le laboratoire de Cytogénétique de lignées comportant une translocation. La collecte des familles nécessaires à l'établissement de la carte génétique bovine a bénéficié de l'aide apportée, pour sa conception théorique, par le groupe MMM. Pour la réalisation pratique, l'implication de la SGQA a permis d'obtenir l'aide et le soutien des unités de sélection (notamment URCEO et OGER) ou des structures nationales (Institut de l'élevage, UNCEIA).

Par ailleurs, le groupe français est chargé du développement des bases de données européennes et travaille sur ce projet en concertation avec l'équipe écossaise (AFRC) qui a la même responsabilité au niveau du programme PigMap.

2 / Politique au sein des groupes de cartographie

La cartographie génique nécessite une activité spécifique de recherches fondamentales de haut niveau visant à maîtriser les méthodologies essentielles de la biologie moléculaire. Ce secteur évolue très vite. Les possibilités d'investigation peuvent être décuplées et une nouvelle technique chasser l'autre rapidement. Le noyau de chercheurs de chaque équipe doit donc se libérer d'une partie des tâches de routine (pouvant être considérées comme du développement) afin de participer à l'innovation.

- Des efforts ont été consentis pour l'analyse systématique (isolement d'ADN, isolement et test des microsatellites, typage des animaux) grâce à un investissement de matériels (incubateurs PCR, séquenceurs automatiques) accompagné d'un person-

nel technique spécialisé. L'effort devra être poursuivi, car il est encore insuffisant pour certaines tâches très répétitives (extraction d'ADN), afin d'assurer jusqu'au bout le développement du projet mais aussi de maintenir la dynamique de recherche dans l'équipe.

- Les équipes de cartographie doivent également assurer une véritable coordination entre les activités de cartographie physique et génétique qui concourent au même but final. Cette complémentarité devient de plus en plus évidente. Ainsi les chercheurs impliqués doivent acquérir un minimum de connaissance dans chacune des deux méthodes d'approche pour la cohérence du projet.

- Nous devons développer de façon urgente une gestion informatique des données qui vont très vite s'accumuler.

3 / Les domaines d'application de la cartographie

Cinq domaines de la génétique animale appliquée doivent progressivement bénéficier de l'avancement de ces travaux :

- L'évaluation précoce des génotypes aux loci proches de gènes majeurs non encore clonés devrait constituer une importante application intermédiaire. En effet la ségrégation de gènes majeurs est décrite, ou soupçonnée d'après des analyses statistiques, dans plusieurs espèces (gène de sensibilité à l'Halothane et gène Rn de qualité de la viande chez le Porc, gène de prolificité Booroola chez les Ovins, etc). Le développement de la description de polymorphismes génétiques permettra d'associer ces gènes à des marqueurs, et donc d'identifier le génotype des animaux dès leur naissance. Cette information introduite dans les méthodes d'évaluation des valeurs génétiques devrait améliorer sensiblement les schémas de l'amélioration génétique. On pourra ainsi fonder la sélection, non plus seulement sur une estimation de la valeur génétique des animaux obtenue sur des performances observées, mais aussi sur une caractérisation sûre et précoce de leurs génotypes.

- Les acquis des recherches sur la carte génétique (mise en évidence de sites hautement polymorphes indépendants) contribueront également à l'évolution des méthodes d'identification des animaux et de vérification des filiations.

- La mise en évidence de régions du génome intervenant dans la variabilité de caractères quantitatifs (détection de "QTL": Quantitative Trait Loci) est la perspective principale de la cartographie, dont les résultats participeront au renouvellement des méthodes de sélection. Un accroissement substantiel d'efficacité est attendu par rapport à la sélection sur collatéraux notamment sur des caractères à faible héritabilité. Les connaissances acquises sur la répartition chromosomique des principaux gènes impliqués dans les caractères de production devraient aussi permettre une meilleure gestion de la variabilité génétique : choix des animaux dans les protocoles d'introgession de gènes majeurs, gestion de la variabilité génétique des races sélectionnées.

- L'appréciation de la diversité génétique des races, dont la caractérisation a été entreprise notamment chez les Bovins par les analyses des groupes sanguins, pourra être progressivement affinée. L'intro-

duction d'un nombre croissant de marqueurs permettra à terme de déterminer les régions chromosomiques qui sont statistiquement associées aux différences interraciales et de mieux maîtriser les croisements entre races. En outre une bonne caractérisation génétique des populations permettra de concevoir des méthodes de gestion et de conservation de la variabilité génétique plus pertinentes que celles, actuellement disponibles, qui sont fondées seulement sur la gestion des généalogies.

- L'information de position recueillie à partir de ces cartes sur les gènes d'intérêt zootechnique pourra être exploitée comme base de stratégie pour le clonage et l'isolement de ces gènes. D'autre part, dans le cas des opérations de transfert de gènes, elle aidera au contrôle du site d'insertion dans le génome receveur.

4 / La méthodologie de la cartographie génique

L'élaboration des cartes géniques peut être maintenant entreprise avec une grande efficacité grâce à deux facteurs essentiels :

- la découverte d'une source quasi inépuisable de polymorphismes dans l'ADN (paires de bases modifiées, insertions, délétions, variations de séquences répétées) et par conséquent de marqueurs génétiques indispensables à l'établissement des groupes de liaison génétique ;

- la mise en évidence de fortes homologues entre espèces qui permettent de tirer parti efficacement des acquis des cartes humaine et murine. Cette approche est facilitée par le développement spectaculaire des possibilités techniques de localisation des gènes.

L'objectif est de dresser une carte globale comportant des marqueurs distants en moyenne de 20 cM, pour une longueur de génome estimée à environ 30 Morgans, une partie d'entre eux étant localisée sur les chromosomes. Pour atteindre ce premier but fondamental, la cartographie génétique sera essentiellement fondée sur l'utilisation des marqueurs de type microsatellite.

Utilisation des marqueurs de type microsatellite

La plupart des sondes d'ADN sont susceptibles de révéler, par la technique "RFLP" (Restriction Fragment Length Polymorphism), un polymorphisme de type diallélique. Le risque est que souvent un seul allèle soit présent dans les familles réunies pour l'étude des ségrégations. De plus, l'analyse et le typage des animaux à l'aide de tels marqueurs sont laborieux. Il existe dans le génome des zones appelées microsatellites ayant un plus large polymorphisme. Les microsatellites sont des séquences formées par la répétition d'un motif dinucléotidique, le plus souvent (TG). Le génome de la plupart des espèces domestiques contient de l'ordre de 60 000 de ces séquences. Leur haut degré de polymorphisme est dû à la variation entre individus du nombre de répétitions (TG) à un locus donné. Les microsatellites peuvent être recherchés et clonés. Ils ont trois propriétés essentielles qui en font des outils de premier ordre pour la cartographie : (1) ils sont capables de révéler un grand polymorphisme, (2) ils sont bien répartis le long du

génomique, (3) ils peuvent être étudiés d'une façon quasiment automatisée.

Pour obtenir des marqueurs microsatellites, la stratégie la plus classique consiste à (1) réaliser dans un plasmide une banque génomique de fragments de l'ordre de 600 paires de bases, et isoler les plasmides ayant une insertion contenant une séquence (TG)ⁿ, (2) séquencer ces fragments, (3) déterminer un couple d'amorces de part et d'autre du motif répété (TG)ⁿ, (4) amplifier par PCR ce fragment contenant la séquence (TG)ⁿ à partir d'ADN de différents animaux, (5) faire migrer ces produits d'amplification sur gel de séquençage pour mettre en évidence un éventuel polymorphisme (différence dans la taille des fragments d'ADN amplifiés).

Un séquenceur 373 A de chez Applied Biosystem (financement INRA-GREG-Génomique 1991) équipé d'un système d'analyse de taille des fragments microsatellites, permet d'analyser les animaux. Ainsi, jusqu'à 200 tests de microsatellites pourront être réalisés simultanément sur un seul gel grâce à un marquage avec différentes molécules fluorescentes.

Par exemple, dans le cas du porc, si le test de quelques 1 000 animaux F2 (nos animaux plus les animaux des 4 autres pays d'Europe) doit être entrepris, sur un total de 100 microsatellites en France, le nombre de réactions PCR à réaliser sera de 100 000 (appareils PCR utilisant l'équivalent de plaques de microtitration). Au rythme de 150 à 200 tests par gel, il faudra 700 gels pour passer tous les animaux. Avec un gel par jour il faudra 3 ans pour typer tous les animaux.

Le nombre d'animaux nécessaire est en effet important car les études de ségrégations génétiques avec les sondes microsatellites nécessitent une collection d'ADN génomique issue de familles (les F2, les parents et idéalement les grands-parents). Un point essentiel est d'optimiser la diversité génétique dans ces familles. Chez le porc, la taille des portées et le rythme de reproduction sont un avantage pour l'analyse des ségrégations, mais la diversité génétique des races européennes actuelles est relativement réduite. C'est pourquoi les équipes engagées dans le programme européen BRIDGE-PigMap ont décidé de réaliser des croisements entre porcs européens et porcs chinois. Ces croisements révèlent de grandes différences génétiques pour les caractères de production (taille de portée, qualité de carcasse, efficacité alimentaire, comportement, etc.), permettant d'envisager dans de bonnes conditions la recherche des régions chromosomiques responsables de la variabilité de ces caractères quantitatifs. Par contre, chez les bovins, la diversité génétique des races et croisements existant dans les élevages privés est jugée suffisante. L'insémination artificielle et la transplantation embryonnaire offrent également de larges possibilités pour construire des familles informatives et le programme BIOTECH-BovMap s'oriente vers cette solution.

5 / Utilisation des marqueurs moléculaires classiques : cartographie physique

5.1 / Cartographie comparée

Avec les travaux de cartographie entrepris sur diverses espèces, la notion d'une conservation de certains groupes de liaison et de synténie s'est dégagée progressivement. Après avoir observé une grande similitude entre les structures des chromosomes sexuels X chez les différents mammifères, la conservation de segments chromosomiques entiers est devenue une donnée générale. La ressemblance des cartes permet, dans certains cas, l'utilisation de modèles animaux pour l'étude de maladies héréditaires humaines ; inversement, l'identification et le clonage de gènes responsables d'anomalies héréditaires chez l'Homme ou la Souris permettront de formuler des hypothèses sur la nature de certains gènes majeurs. Cette cartographie comparée pourra également être utile chez l'homme pour la recherche de QTL difficile à envisager directement dans cette espèce. Dans un domaine plus fondamental, la carte comparée permet de donner une interprétation de l'organisation du génome, notamment de l'origine des familles multigéniques et apporte de nouveaux éclairages aux théories phylogéniques.

L'utilisation de ces données de la cartographie comparée constitue de ce fait un élément important des stratégies de cartographie à mettre en oeuvre, même si cette approche a ses limites dans la mesure où la conservation d'éléments génétiques communs à travers les espèces n'est que partielle. L'idée de base, pour l'établissement de la carte physique des espèces d'élevages est que si un groupe de gènes est synténique aussi bien chez l'Homme que chez la Souris, il y a de fortes chances pour qu'il en soit de même dans d'autres espèces. Cette démarche peut permettre de trouver rapidement des marqueurs judicieusement distribués le long du génome.

Dans ces conditions, chaque groupe de gènes conservé chez l'Homme et la Souris sera testé, la localisation physique de celui-ci par hybridation *in situ* permettra avec une bonne fiabilité d'orienter et de localiser le groupe entier.

Un travail systématique est engagé pour localiser tous les gènes disponibles (carte physique). Bien que beaucoup des gènes étudiés ne présentent pas un polymorphisme suffisant ou facile à exploiter, et donc non directement utile pour la carte génétique, cette activité permet de développer les aspects de cartographie comparée. Il n'est pas toujours possible de se procurer les sondes nécessaires notamment pour l'étude d'une fonction physiologique fondamentale. Afin de contourner ce problème, les sondes nécessaires seront fabriquées par PCR à partir d'amorces "consensus" choisies par comparaison de séquences de gènes bien conservés dans différentes espèces. Les gènes intervenant dans des fonctions physiologiques importantes seront ainsi isolés chez le porc et les bovins et feront, entre autre, l'objet d'un séquençage systématique.

Une source importante de sondes cDNA sera également exploitée par la création de banques cDNA issues notamment de mamelles bovines et de cellules folliculaires chez le porc. Pour plus d'efficacité, des

processus de "normalisation de ces banques cDNA" devront être envisagés afin d'obtenir une meilleure représentation des gènes peu transcrits en ARN. Ces banques cDNA seront donc une source importante de sondes utile pour faire progresser la carte physique du génome et, après séquençage, représenteront une somme d'informations non négligeable pour la comparaison de séquences d'ADN dans les différents génomes de mammifères et en particulier par rapport à l'Homme.

5.2 / Utilisation des vecteurs cosmidiqes

Différentes approches sont utilisées pour profiter des données génétiques et physiques. La localisation des sondes cosmidiqes est devenue très rapide grâce à la fluorescence. Cette approche permet de disposer rapidement d'un grand nombre de repères très bien localisés. L'idée est d'utiliser des cosmides porteurs d'un gène connu et d'un site (TG)ⁿ polymorphe. Actuellement de tels cosmides ont rarement été isolés chez les animaux domestiques. De plus, les méthodes de séquençage des zones adjacentes au site (TG)ⁿ au sein d'une quarantaine de kilo-bases d'ADN ne sont pas simples. Des astuces sont recherchées pour faciliter cette étape (un sous-clonage classique est pratiqué pour le moment). L'utilisation de cosmides humains disponibles en grand nombre, qui permettraient de progresser rapidement en terme de cartographie comparée, n'a pas donné de résultats très probants pour le moment. Enfin, les méthodes nouvelles, tels que le clonage dans des chromosomes artificiels de levure (YAC), très en vogue chez l'homme actuellement, ne sont pas utilisées chez les animaux domestiques pour le moment.

5.3 / Utilisation du trieur de chromosomes

Dans le cas des sites microsatellites, l'ADN adjacent isolé est de l'ordre de 600 pb. Cette taille réduite, choisie pour limiter les travaux de séquençage, ne

permet pas de mettre en oeuvre les techniques de localisation par hybridation *in situ*. Les chromosomes porteurs de ces microsatellites seront déterminés grâce au tri de chromosomes dans le cas particulier du porc. En effet, dans cette espèce l'utilisation des techniques du PCR et de l'hybridation *in situ* a permis de faire une avancée intéressante. Le tri de chromosome permet de séparer presque tous les chromosomes du porc, et, depuis peu, tous les chromosomes ont été identifiés par des expériences de "chromosome Painting" (par le groupe français) à l'aide d'une technique originale d'amplification de l'ADN contenu dans chaque spot. L'ensemble du caryotype en flux ainsi déterminé permet donc d'utiliser les chromosomes triés pour pratiquer par PCR l'assignation des marqueurs génétiques, principalement des microsatellites, isolés au laboratoire. De plus, l'obtention de fragments amplifiés à partir d'un chromosome particulier, permet de construire des banques d'ADN partielles spécifiques de ce chromosome. Nous pourrions en particulier isoler les microsatellites spécifiques d'un chromosome pour remplir les régions dépourvues de marqueurs. Pour le moment ce travail est beaucoup moins avancé chez les bovins où les chromosomes sont plus difficile à isoler.

Références bibliographiques

Gellin J., Grosclaude F., 1991. Analyse du génome des espèces d'élevage. Projet d'établissement de la carte génétique du porc et des bovins. INRA Prod. Anim., 4, 97-105.