

J. GELLIN et F. GROSCLAUDE*

INRA Laboratoire de Génétique Cellulaire

31326 Castanet-Tolosan Cedex

* INRA Laboratoire de Génétique

biochimique

78352 Jouy-en-Josas Cedex

Analyse du génome des espèces d'élevage :

projet d'établissement de la carte génétique du porc et des bovins (1)

Chez l'homme, l'analyse du génome est très avancée puisqu'on connaît à ce jour plus de 5 000 marqueurs génétiques. La carte génétique met notamment en évidence les liaisons génétiques entre ces marqueurs et des gènes intervenant dans les maladies héréditaires. Chez les espèces d'élevage, les cartes génétiques sont encore très rudimentaires : 116 gènes étudiés chez le bovin, 40 chez le porc. Les recherches entreprises sur les génomes de ces espèces devraient conduire à une plus grande efficacité de la sélection, par la meilleure connaissance du déterminisme des caractères et par l'identification précoce et plus précise des génotypes.

1 / Les motivations et les perspectives

1.1 / Les finalités

L'amélioration génétique des espèces d'élevage porte actuellement sur un nombre restreint de caractères considérés comme prioritaires (croissance, efficacité alimentaire, quantité de viande chez le porc, quantité de matières protéiques et de matières grasses du lait pour les espèces laitières par exemple). Elle s'appuie sur les méthodes de la génétique quantitative,

qui suppose un déterminisme polygénique, et nécessite la mesure des performances sur un grand nombre d'animaux, opération lourde et coûteuse prise en charge pour une grande part par les organisations d'élevage. Dans ce contexte, faute de pouvoir être mesurés de manière technique ou économiquement acceptable, d'autres caractères intervenant dans l'économie des productions ne sont pas pris en compte, ou ne le sont que très partiellement selon les espèces ou les situations (caractères de reproduction, de résistance aux maladies ou d'adaptabilité en général). Or ces caractères, qui sont aussi sous contrôle génétique mais généralement moins étroit que les caractères considérés prioritairement en sélection, mériteraient des efforts d'amélioration. La connaissance de gènes intervenant dans leur déterminisme pourrait permettre de le faire avec une efficacité nettement accrue par rapport aux méthodes basées sur les seules mesures de performances. Même dans le cas des caractères principaux, l'identification de gènes sous-jacents pourrait être utilement exploitable. Il est donc clair, depuis des décennies, que seule une analyse approfondie du génome comportant l'identification de gènes contrôlant les caractères d'importance économique, la détection de leur polymorphisme et l'évaluation de leurs relations permettrait de franchir une nouvelle étape dans le perfectionnement des méthodes de sélection.

Résumé

Comparées à celles de l'homme et de la souris, les cartes génétiques des espèces d'élevage sont encore très rudimentaires. Toutefois, la gamme des techniques actuellement disponibles permet désormais de progresser rapidement dans l'établissement de ces cartes. L'objectif immédiat des équipes de génétique moléculaire et cytogénétique de l'INRA est d'identifier, pour les génomes bovin (à Jouy-en-Josas) et porcin (à Toulouse essentiellement), un premier réseau de marqueurs distants d'environ 20 centimorgans, soit un ensemble d'environ 150 marqueurs. Compte tenu du fait que l'organisation du génome est relativement conservée d'une espèce de mammifères à l'autre, les connaissances acquises chez l'homme et la souris permettront, dans une certaine mesure, de guider les travaux de cartographie des espèces d'élevage. On attend de ces recherches : 1) la mise en évidence des régions du génome intervenant dans la variabilité des caractères quantitatifs ; 2) des bases de départ pour le clonage des gènes d'intérêt zootechnique ; 3) le repérage précoce de gènes majeurs à l'aide de gènes marqueurs proches ; 4) une meilleure appréciation de la diversité génétique des races et 5) une précision accrue dans l'identification des animaux et le contrôle des filiations. Des collaborations internationales se mettent en place, notamment dans le cadre de la CEE.

(1) Texte présenté devant le Conseil scientifique de l'INRA, le 20 novembre 1990.

Soulignons toutefois, dès à présent, que, si l'accès au polymorphisme des gènes directement impliqués dans les caractères à améliorer est évidemment l'idéal à atteindre, il est possible et il peut être efficace d'opérer, dans une étape intermédiaire, sur d'autres gènes ou sites polymorphes situés dans leur voisinage. C'est cette approche indirecte dont il sera question plus loin lorsque seront utilisés les termes de « gènes marqueurs » ou de « marquage » du génome.

L'existence, dans le Département de Génétique animale de l'INRA, des laboratoires de Génétique cellulaire (Toulouse), de Génétique biochimique, de Cytogénétique et de Radiobiologie appliquée (Jouy-en-Josas) témoigne d'un souci déjà ancien de s'investir dans l'analyse du génome des espèces d'élevage. Malheureusement, l'élaboration de la carte génétique des espèces d'élevage n'a progressé que très lentement, compte tenu de la lourdeur des techniques alors disponibles comparée à la petitesse des équipes engagées en France comme d'ailleurs à l'étranger. En dehors d'un travail de cartographie du porc et du lapin ébauché depuis 10 ans à Toulouse, les équipes du Département de Génétique animale ont donc eu plutôt tendance à concentrer leurs efforts sur l'analyse de certains gènes importants en élevage (gènes des protéines du lait, gène de sensibilité au stress du porc, gène de fertilité « Booroola » du mouton). Toutefois, la nécessité d'entreprendre, dès que les techniques et les moyens le permettraient, une analyse du génome des espèces d'élevage, est restée inscrite dans les intentions du Département de Génétique animale.

1.2 / Le contexte désormais favorable

L'évolution spectaculaire des techniques et des connaissances fait qu'il n'existe plus, à l'heure actuelle, de limitation majeure à la réalisation de cet objectif, et ceci grâce à la conjonction de deux facteurs essentiels :

- la découverte d'une source paraissant presque inépuisable de polymorphismes dans l'ADN, et l'existence de techniques simples pour les mettre en évidence. Ceci ouvre un accès potentiel à des centaines de marqueurs du génome. Il s'agit dans ce domaine, d'une véritable révolution.

- la mise en évidence de fortes homologies dans les cartes génétiques des mammifères. Cette situation permet de baser une stratégie de localisation de gènes dans les espèces d'élevage sur la carte génétique d'espèces déjà beaucoup mieux connues (homme, souris) ; à noter aussi qu'une partie des sondes humaines et murines est utilisable dans les espèces d'élevage.

La cartographie du génome des animaux d'élevage peut donc désormais progresser rapidement sur deux fronts complémentaires : 1) la localisation de gènes connus en s'appuyant notamment sur les cartes génétiques de l'homme et de la souris, et 2) la mise au point de sondes spécifiques de marqueurs du génome de chacune des espèces.

1.3 / L'objectif à moyen terme

L'objectif à moyen terme serait d'aboutir à une couverture aussi uniforme que possible du

génome des espèces concernées par des marqueurs. Ceci peut correspondre à 150-200 marqueurs polymorphes, espacés de 20 centimorgan en moyenne. Il y a seulement quelques années, cet objectif aurait pu paraître utopique. Il n'est désormais qu'ambitieux, et tout à fait à notre portée, à condition que ces recherches reçoivent une impulsion institutionnelle, et s'effectuent dans un climat de coopération internationale constructif.

1.4 / Les domaines d'application

Au moins cinq domaines de la génétique animale appliquée doivent, à plus ou moins long terme, bénéficier de ces travaux.

1. La mise en évidence, grâce au réseau de marqueurs, de régions du génome intervenant dans la variabilité des caractères quantitatifs, aussi appelées « QTL » pour l'anglais « Quantitative Trait loci ». C'est la perspective la plus générale de la cartographie. Même si le gain espéré paraît faible par rapport aux possibilités actuelles de la sélection pour des caractères de bonne heritabilité comme ceux de la production laitière, un accroissement substantiel d'efficacité est attendu pour des caractères à faible heritabilité. De plus, comme nous l'avons vu, l'objectif est aussi de tenter de prendre en compte, dans la sélection, des caractères jusqu'ici délaissés. On attend de cette démarche un renouvellement significatif des méthodes de sélection.

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

3. Dès à présent, l'évaluation précoce des génotypes aux loci proches de gènes majeurs (gènes dont l'effet, important, est supérieur à l'écart type du caractère) non encore clonés devrait constituer une importante application. En effet la ségrégation de gènes majeurs est décrite, ou soupçonnée, d'après des analyses statistiques, dans les populations (gène de fertilité « Booroola » du mouton par exemple). Le développement de la cartographie permettra de repérer des marqueurs proches de ces gènes et donc d'identifier le génotype des animaux dès leur naissance grâce à ces marqueurs. Cette information, introduite dans les méthodes d'évaluation des valeurs génétiques, devrait améliorer sensiblement les schémas de l'amélioration génétique grâce à cette caractérisation sûre et précoce des génotypes.

4. L'appréciation de la diversité génétique des races. La sélection pratiquée sur les espèces d'élevage a entraîné l'émergence de races spécialisées, dont la caractérisation génétique, entreprise notamment chez les Bovins à l'aide des marqueurs disponibles jusqu'ici (groupes sanguins, protéines) pourra être progressivement affinée avec un ensemble de marqueurs plus nombreux et plus représentatifs de l'ensemble du génome. Par ailleurs, l'introduction d'un nombre croissant de marqueurs permettra, à terme, de déterminer les régions chromosomiques qui sont statistiquement associées

Ségrégation : mode de répartition des allèles d'un individu à sa descendance.

Clonage de gène : technique permettant d'isoler et de multiplier des millions de fois la séquence d'ADN d'un gène, ou une série de fragments représentant cette séquence. Elle utilise la multiplication dans une cellule hôte (bactérie, levure...) d'un vecteur (phage, plasmide...) ayant intégré la séquence.

aux différences entre races, et de mieux maîtriser les croisements. 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.

5. Les acquis des recherches sur la carte génétique (mise en évidence de sites polymorphes indépendants) contribueront également à rendre plus précise l'identification des animaux, donc plus efficace le contrôle des filiations (60 000 animaux concernés en France actuellement).

Il est intéressant et démonstratif de situer l'état des connaissances sur la carte génétique des espèces d'élevage en le comparant aux résultats acquis sur la carte humaine.

2 / Etat d'avancement des cartes génétiques dans les espèces d'élevage : comparaison avec l'état de la carte humaine

2.1 / La carte génétique humaine

a / Etat actuel

On estime que le génome humain (3.10^9 nucléotides) comprend de 50 000 à 100 000 gènes fonctionnels. Son analyse est très avancée grâce au progrès de la génétique moléculaire et à l'activité d'un très grand nombre d'équipes travaillant en collaboration au niveau international. Tous les deux ans, une conférence fait le point sur la carte génétique humaine. En 1973, 56 gènes seulement étaient localisés sur les chromosomes. En 1989 on connaissait la localisation de 1 631 gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme général ou dans certaines fonctions différencierées ; 900 d'entre eux environ ont été isolés et clonés. Un grand nombre d'allèles de ces gènes sont responsables de pathologies. Par ailleurs il faut ajouter la localisation de 3 417 segments d'ADN à fonction inconnue ou sans fonction et de nombreux marqueurs associés à des anomalies chromosomiques, ce qui représente un total de 5 161 marqueurs génétiques exploitables.

b / Objectif principal : développement du diagnostic génétique et de la médecine préventive

L'intérêt majeur de cette cartographie est de permettre la mise en évidence de liaisons génétiques étroites entre certains de ces marqueurs et des gènes intervenant dans les maladies héréditaires et de conduire éventuellement à la localisation et l'isolement ultérieur de ces gènes eux-mêmes. Certains d'entre eux ont déjà été isolés. C'est le cas des gènes de la maladie de Duchenne, de la chorée de Huntington et de la mucoviscidose.

La connaissance de ces gènes déficients permet d'effectuer une détection précoce chez les

individus atteints. En effet, comme le dit J. Frézal : « C'est dans le domaine de la prévention que l'on voit se dessiner les perspectives les plus proches de la cartographie. C'est qu'en effet, il est déjà possible de déduire la présence d'un gène de celle d'un marqueur qui lui est étroitement lié, c'est-à-dire de savoir si un enfant à naître est voué à une maladie ou si un sujet déjà né, enfant ou adulte, est prédisposé à telle ou telle affection. Le nombre des maladies qu'il sera ainsi possible de repérer va augmenter rapidement ».

Le développement de cette médecine donne la possibilité d'intervenir très précocement, mais selon des normes qui sont à définir strictement compte tenu des problèmes éthiques qui ne manquent pas de se poser chez l'Homme.

c / Développement des collaborations en génétique humaine

Depuis une dizaine d'années la cartographie du génome est devenue un thème majeur de la génétique humaine. Etant donné l'ampleur du travail, de larges collaborations internationales se sont développées. Un exemple est donné par l'initiative du Professeur Jean Dausset de créer, en collaboration avec le groupe de R. White (Salt Lake City), le Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH). Son but est de réunir des échantillons de référence provenant de plusieurs dizaines de familles complètes et nombreuses comprenant les parents, les quatre grands-parents et de nombreux enfants afin que la communauté scientifique dispose de grandes familles de référence pour l'étude des ségrégations génétiques. L'idée est également de mettre à la disposition de cette communauté une carte de référence pouvant être utilisée pour la localisation de nouveaux gènes. Cet effort a déjà porté ses fruits avec l'établissement de cartes atteignant une résolution de 5 à 10 cM pour l'ensemble des chromosomes humains. Cette carte génétique est complétée par la carte physique où les marqueurs sont localisés aussi finement que possible par référence aux bandes chromosomiques.

Synténie : deux locus sont dits « synténiques » lorsqu'ils sont situés sur un même chromosome.

d / Tendances actuelles et développement de la carte génétique humaine

Un grand projet financé par la Communauté Européenne vise à obtenir, dans les 3 à 5 ans à venir, une carte génétique encore plus précise et plus fiable pour la recherche de liaisons entre marqueurs et gènes déficients et pour le développement du diagnostic précoce des anomalies génétiques. A la limite, cette carte génétique humaine aboutira à l'identification des bases nucléotidiques le long des molécules d'ADN du génome humain.

Un effet « boule de neige » caractérise cette activité de cartographie. La multiplication des marqueurs localisés augmente le potentiel d'application de façon exponentielle. Compte tenu de ce fait, le rythme des travaux dans ce domaine sera encore très soutenu dans la décennie à venir.

De plus, on assiste à des efforts importants pour améliorer les techniques de cartographie. La localisation des gènes est de plus en plus

Liaison génétique : deux locus sont dits « liés » lorsque leurs allèles ne sont pas transmis indépendamment. Ceci indique que les 2 locus se trouvent dans la même région chromosomique. Le degré de liaison, ou « distance génétique » entre les 2 locus, est mesuré par la proportion de gamètes recombinés parmi l'ensemble des gamètes. L'unité de mesure est le « centimorgan » (1 centimorgan = 1 % de recombinations). Deux locus liés sont nécessairement synténiques, alors que deux locus synténiques ne sont pas nécessairement liés : au-delà d'une certaine distance (50 centimorgans) les allèles de 2 locus synténiques sont transmis indépendamment.

Tableau 1. Comparaison du nombre total de gènes étudiés chez l'homme et dans quatre espèces d'animaux domestiques (en 1989).

| Espèce | Nombre de paires de chromosomes | Groupes de liaison et de synténie | Nombre total de gènes étudiés |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Homme | 23 | 24 | 1 631 |
| Lapin | 22 | 17 | 55 |
| Porcin | 19 | 17 | 40 |
| Bovin | 30 | 26 | 116 |
| Ovin | 27 | 16 | 35 |

précise, les procédures d'approche et d'isolation des gènes devenant de plus en plus performantes.

2.2 / La carte génétique des animaux d'élevage

En dehors de celles des primates et de la souris, les cartes génétiques des animaux sont très peu développées. L'état actuel des connaissances (groupes de synténie et de liaison) est résumé dans le tableau 1.

Il est clair que, comparées à celle de l'homme, les cartes génétiques des espèces d'élevage sont encore très rudimentaires. De plus il faut ajouter aux 1 631 gènes connus chez l'homme, rappelons-le, 3 417 segments d'ADN, de fonction inconnue, jouant le rôle de marqueurs. Ainsi, alors que chez l'homme on dispose, nous l'avons vu, d'un réseau de marqueurs sur tous les chromosomes, dans les espèces d'élevage, certains chromosomes sont encore dépourvus de tout marqueur. Inversement certains groupes de liaison ou certaines synténies ne sont pas encore affectés à leur chromosome. Ces chiffres montrent parfaitement le chemin qui reste à parcourir dans les espèces d'élevage.

3 / Les stratégies et les projets de cartographie

Dans ce domaine de la carte génétique des espèces d'élevage, comme dans bien d'autres domaines, l'INRA a été confronté au problème du choix des espèces à étudier. Ses obligations vis-à-vis de l'aval lui interdisent de se limiter à une espèce modèle. A l'opposé, il lui est impossible de mener le travail de front sur toutes les espèces d'élevage. En définitive, le choix s'est porté sur deux espèces parmi les plus importantes, le porc et les bovins. On sait toutefois que les homologies sont telles entre bovins, ovins et caprins, que les données acquises chez les premiers seront aisément transposables aux deux autres espèces. Ce choix laisse par contre de côté, pour le moment, une espèce économiquement importante, la poule.

Ces travaux sur le porc sont conduits par un groupe de laboratoires constitué autour du Laboratoire de Génétique cellulaire de Toulouse, les travaux sur les bovins par un groupe constitué autour du Laboratoire de génétique biochimique de Jouy-en-Josas. Ces choix sont

en continuité avec les orientations passées de ces Laboratoires.

3.1 / Stratégie commune aux deux espèces

L'objectif est de dresser une carte globale comportant des marqueurs (gènes connus ou sites anonymes) distants en moyenne de 20 centimorgans, pour une longueur de génome estimée à environ 30 morgans. La stratégie est fondée sur :

- une cartographie physique (localisation des gènes sur les chromosomes) faisant largement appel aux données de la cartographie comparée ;
- une cartographie génétique (distances génétiques) utilisant des marqueurs suffisamment polymorphes et judicieusement répartis sur l'ensemble des chromosomes.

Bien entendu, les études plus spécifiques de certains gènes majeurs seront poursuivies parallèlement, au fur et à mesure de la mise en évidence de ces gènes.

a / Intérêt et utilisation de la cartographie comparée

Une même série de gènes homologues a désormais été localisée dans une vingtaine d'espèces de mammifères (primates, rongeurs, carnivores, espèces d'élevage). Une analyse comparée a permis de révéler des similitudes dans leur répartition cartographique. Mais c'est bien entendu la comparaison des cartes génétiques les plus détaillées, celles de l'homme et de la souris qui renseigne le plus sur l'importance des similitudes entre espèces. L'examen de la localisation de 330 loci homologues démontre la conservation de 51 segments, certains fragments chromosomiques étant d'ailleurs plus conservés que d'autres. L'approche comparative a bien entendu ses limites car la conservation des groupes de liaison à travers les espèces n'est que partielle. Toutefois, l'idée de base, pour l'établissement de la carte des espèces d'élevage, est que, si un groupe de gènes est synténique aussi bien chez l'Homme que chez la souris, il y a des chances pour qu'il en soit de même dans d'autres espèces.

Dans ces conditions, on tentera de retrouver, dans l'espèce étudiée, chaque groupe de synténie conservé chez l'Homme et la souris en recherchant, dans un ensemble d'hybrides cellulaires ou sur les ADN chromosomiques isolés

Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) : le polymorphisme de l'ADN se traduit, entre autres, par un polymorphisme dans la répartition des points de clivage par les enzymes de restriction (enzymes spécifiques de courtes séquences nucléotidiques). Les allèles d'un gène peuvent donc donner, par coupe enzymatique, des fragments de longueur différente. Ce polymorphisme de longueur est décelable par électrophorèse lorsqu'on possède une sonde nucléotique spécifique du gène.

par tri de chromosomes, les deux marqueurs les plus distants du groupe. Si ces deux marqueurs sont synténiques, la localisation physique de ceux-ci par hybridation *in situ* permettra avec une bonne fiabilité d'orienter et de localiser le groupe entier. Les sondes utilisées pour ces étapes n'ont pas besoin de révéler un polymorphisme. Par contre, dans ce groupe, il faudra ensuite trouver des marqueurs capables de révéler un polymorphisme important pour établir les groupes de liaison génétiques. La figure 1 donne un exemple d'utilisation, chez le porc, de la cartographie comparée.

b / Gènes et marqueurs polymorphes du génome

- *Gènes ou marqueurs détectés à l'aide de sondes homologues*

Le nombre de sondes moléculaires spécifiques de chaque espèce (gènes ou fragments anonymes d'ADN) isolés dans les différents laboratoires est en constante augmentation. La tendance générale est de les mettre en circulation libre, mais, bien entendu, souvent payante. Dans le cadre du présent projet, il sera nécessaire de disposer d'un grand nombre de sondes afin de retenir celles qui, dans les conditions expérimentales choisies, présenteront un polymorphisme exploitable. Dans ces conditions, il est envisagé de préparer des sondes spécifiques supplémentaires à partir de génotéques de chromosomes séparés par tri des chromosomes (chez le porc) ou à partir de banques de cDNA (mamelle bovine).

- *Gènes et marqueurs détectés à l'aide de sondes hétérologues (humaines ou murines)*

Des sondes d'origine humaine ou murine sont disponibles, soit contre paiement dans le commerce (ATCC : American Type Culture Collection, CRI : Collaborative Research Incorporated), soit gratuitement auprès de leurs détenteurs. Ces sondes permettent, sous certaines conditions, d'obtenir une hybridation croisée satisfaisante avec l'ADN des espèces d'élevage. Cette stratégie est utilisée dans le cadre de l'étude des données de la cartographie comparée. Environ la moitié des sondes donnent des résultats exploitables soit avec la technique de Southern, soit en hybridation *in situ*, soit avec les deux techniques. De telles sondes ont déjà été utilisées pour la carte génétique du porc.

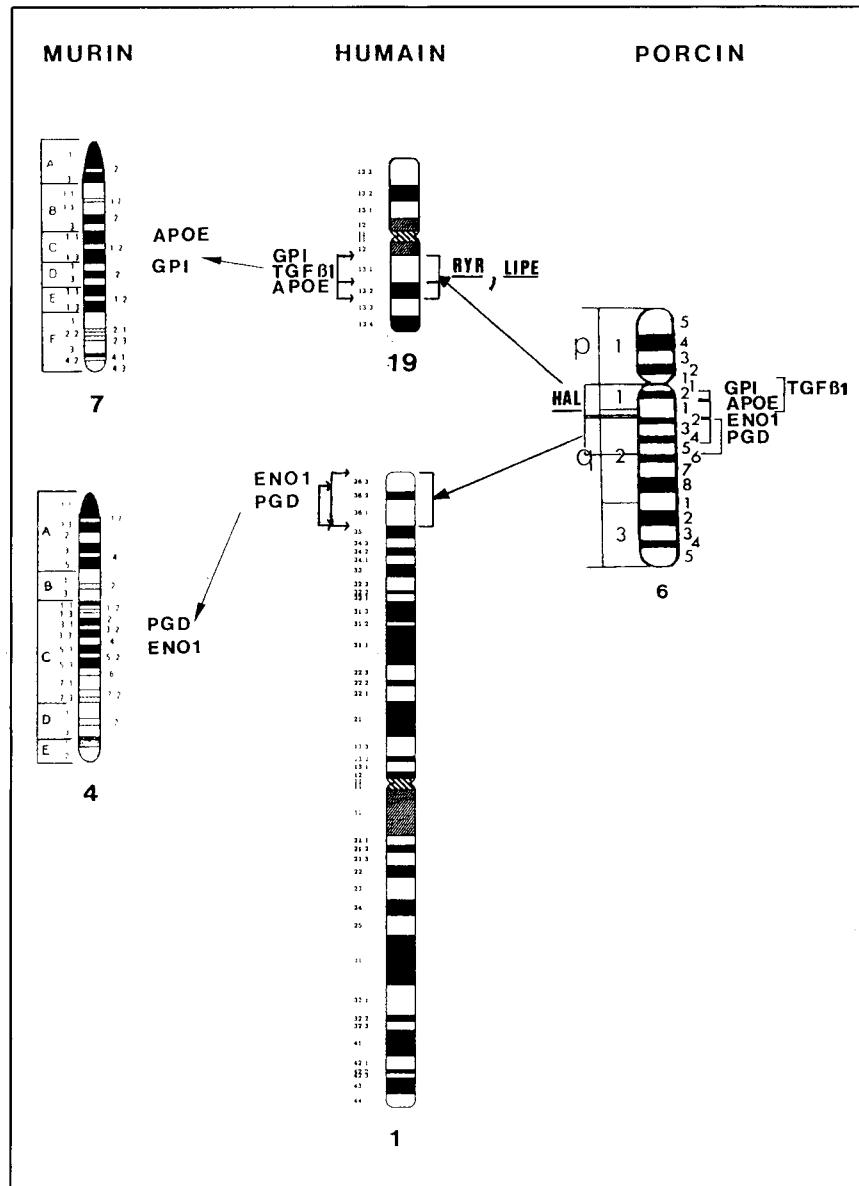
- *Marqueurs détectés à l'aide de sondes minisatellites ou microsatellites*

La plupart des sondes que nous venons de décrire révèlent un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (désigné par le sigle anglais RFLP), de type diallélique, (figure 2) et on court donc le risque qu'un seul allèle soit présent dans les familles réunies pour l'étude des ségrégations, interdisant alors l'analyse projetée. Or il existe dans le génome des zones ayant un plus large polymorphisme. Il s'agit, en général de régions non codantes et donc moins soumises à la sélection. Les zones sont qualifiées d'hypervariables. Elles peuvent être recherchées et clonées, afin d'obtenir des sondes bien plus performantes dans les études de ségrégations.

Figure 1. Exemple d'utilisation de la cartographie comparée : étude de marqueurs entourant le gène de sensibilité au stress (Hal = Halothane) chez le porc. Les données de liaison génétique, les localisations de ces gènes chez l'Homme et la souris, et les résultats récents obtenus par hybridation *in situ*, suggèrent que la région du chromosome 6 porcin correspond à la juxtaposition de fragments des chromosomes 1 et 19 humains. Chez l'Homme, un défaut héréditaire analogue (syndrome d'hyperthermie maligne) est génétiquement lié à cette région du chromosome 19. Dans cette zone, deux gènes (RYR et LIPF) sont soupçonnés, de par leur fonction biologique, de présenter des allèles responsables de ce syndrome ; leurs homologues porcins constituent donc des candidats potentiels pour le gène Hal. Le schéma ci-dessous compare les cartes murine (chromosomes 4 et 7), humaine (chromosomes 1 et 19) et porcine (chromosome 6).

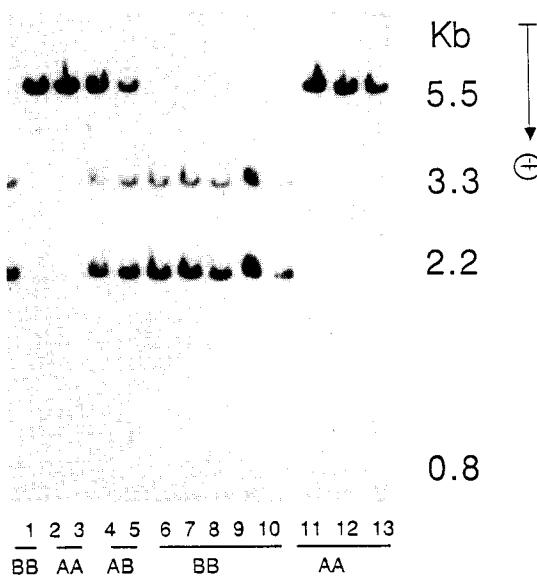
Les données recueillies chez l'Homme et le Porc ont été obtenues par hybridation *in situ*. Les informations dont on dispose chez la souris sont d'ordre génétique (distance en cM). L'ordre des deux loci GPI et APOE par rapport au centromère a été déterminé ; par contre, celui de PGD et ENO1 n'est pas encore connu. Les positions régionales de APOE et GPI sur le chromosome 7 et de PGD et ENO1 sur le chromosome 4 ne sont pas encore définies.

APOE : apolipoprotéine E ; ENO1 : enolase 1 ; GPI : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; LIPF : lipase hormonodépendante ; PGD : phosphogluconate déshydrogénase ; RYR : récepteur de la ryanodine ; TGF β 1 : transforming growth factor β .



Ces zones hypervariables sont appelées VNTR (pour l'anglais « Variable Number of Tandem Repeats »). Ce sont des loci constitués de séquences d'une dizaine de nucléotides répétées à la suite, en nombre variable, souvent appelées « minisatellites ». Les variations du nombre de répétitions au niveau d'un même

Figure 2. Exemple de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). Il s'agit de la détection des deux allèles de la caséine κ bovine. Avec l'enzyme de restriction Hind III, l'allèle B donne un fragment de 5,5 Kb (Kilobases), alors que l'allèle A donne deux fragments, de 3,3 et 2,2 Kb. Les hétérozygotes A/B (échantillons n° 4 et 5) possèdent les 3 fragments (cliché H. Levéziel).



locus font qu'un même fragment de restriction - les enzymes utilisées coupant en général en dehors de ces séquences - présente des variations de longueur. Ces loci sont polyalléliques (taux d'hétérozygotie élevé) et dispersés dans le génome. Dans des conditions d'hybridation moléculaire peu strictes, chaque sonde VNTR s'hybride avec tous les loci qui comportent des séquences d'ADN plus ou moins complémentaires, donc avec de nombreux loci à la fois. Par contre, dans des conditions d'hybridation plus strictes, chaque sonde de type VNTR ne s'hybride qu'avec le locus qui possède exactement la même séquence d'ADN. L'hybridation donne alors des images plus simples (peu de bandes) tout à fait similaires à celles obtenues dans le cas des RFLP classiques, mais plus polymorphes (le locus comporte en général plus de 2 allèles). La mise en évidence de séquences minisatellites spécifiques de l'espèce étudiée permet ce genre d'analyse (VNTR-unilocus).

D'autres loci VNTR, les microsatellites sont de simples séquences oligonucléotidiques de type (TG) n . Les séquences de ce type peuvent être isolées du génome par criblage de banques de fragments géniques, ou même simplement repérées dans des banques de données. L'utilisation d'amorces spécifiques adjacentes aux séquences TG ainsi isolées permet par PCR de révéler des loci très polymorphes.

L'isolement d'un ensemble de sondes de type VNTR spécifique de l'espèce à cartographier est essentiel pour la progression rapide de la cartographie génétique. Ce travail est déjà engagé aussi bien à Jouy-en-Josas qu'à Toulouse.

Technique « PCR » (« polymerase chain reaction ») : technique permettant de multiplier *in vitro*, un nombre considérable de fois, un fragment d'ADN de séquence connue sans avoir recours au clonage. Elle utilise l'enzyme ADN polymérase.

3.2 / Particularités des deux projets

Si la stratégie d'ensemble est la même dans les deux espèces, il est intéressant d'attirer l'attention sur quelques différences dans les programmes, liées essentiellement aux particularités des deux espèces considérées.

a / Les familles animales

Les études de ségrégation avec les sondes détectant un polymorphisme nécessitent une collection d'ADN génomique issue de familles avec parents et 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 ont décidé de réaliser des croisements entre porcs européens et porcs chinois. Ces croisements révèlent de grandes différences génétiques pour les caractères de production, 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. A noter l'intérêt, pour la mesure des liaisons génétiques, de la technique récente d'analyse directe sur spermatozoïdes, qui pourra, dans certains cas, éviter d'avoir à recourir à des familles animales.

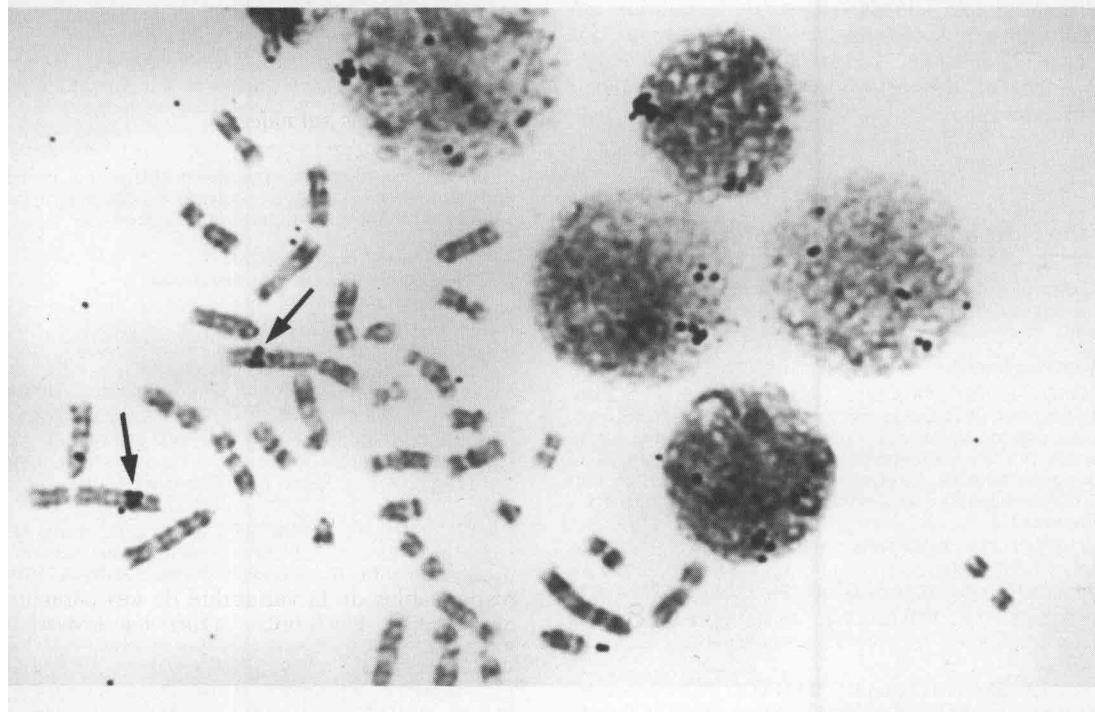
b / Le tri des chromosomes

Une des techniques de base de la cartographie génétique est l'utilisation d'hybrides somatiques qui permet l'établissement de synthèses. Les équipes concernées de Toulouse et de Jouy-en-Josas possèdent actuellement de tels hybrides. Toutefois, le perfectionnement de la technique de tri de chromosomes permet d'ores et déjà d'entrevoir la possibilité de séparer chacun des chromosomes du porc. On peut donc envisager, dans cette espèce, une assignation directe de gènes sur les chromosomes triés, technique qui devrait remplacer progressivement l'utilisation des hybrides somatiques. Pour le moment, une telle percée n'est pas envisageable chez les bovins, où les chromosomes sont beaucoup plus difficiles à séparer.

c / L'hybridation *in situ*

La localisation fine des gènes par hybridation *in situ* est une étape essentielle de la cartographie physique (figure 3). Cette technique, appliquée à des caryotypes à haute résolution, est bien maîtrisée chez le porc grâce à la bonne connaissance des chromosomes dans cette espèce, et permet d'envisager un développement rapide de cette activité. La technique d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes devrait permettre d'affiner les localisations, et d'aborder le travail chez les bovins, pour lesquels elle est en cours de mise au point.

Figure 3. Exemple de localisation d'un gène par hybridation *in situ*, ici le gène de l'interféron α du porc. Les flèches indiquent la localisation des grains correspondant à la sonde radioactive du gène, qui marquent l'emplacement de ce dernier sur la paire de chromosomes porteurs (chromosomes n° 1 du porc) (cliché M. Yerle).



4 / Mise en œuvre de collaborations internationales et nationales

Les équipes concernées à Jouy-en-Josas et à Toulouse ont une expérience approfondie de l'analyse du génome et maîtrisent l'ensemble des techniques et outils nécessaires à l'élaboration des cartes génétiques : cytogénétique, culture cellulaire, production et utilisation de sondes moléculaires, tri chromosomal, localisation par hybridation *in situ*, étude des polymorphismes d'ADN. De plus, sur chacun des deux sites, les travaux de génétique moléculaire et cellulaire bénéficient de l'expérience d'équipes spécialisées en génétique quantitative (modélisation, méthodologie, application) qui apportent leur contribution dans le traitement conceptuel et informatique des données recueillies dans les populations, et par la mise en évidence de gènes majeurs. Cet ensemble intégré de compétences scientifiques (représentant un potentiel d'environ 20 chercheurs), associé à la disponibilité des troupeaux des Unités expérimentales, a peu d'équivalents ailleurs et il est un gage de réussite.

Toutefois, et bien évidemment, la réalisation de ces projets ambitieux impose aussi la mise en place de collaborations organisées avec d'autres laboratoires. En fait, le nombre d'équipes dans le monde annonçant une orientation ou une reconversion vers l'établissement de la carte génétique des espèces d'élevage est impressionnant. Voici un état succint des forces en présence :

- chez le porc : un réseau européen de collaborations entre une dizaine de laboratoires

(Grande-Bretagne, Belgique, Allemagne, Hollande, Suède, Norvège, France) s'est mis en place dans le cadre du projet BRIDGE (« PIG MAP »). L'équipe formée autour du Laboratoire de Génétique cellulaire de Toulouse fait partie de ce groupe. Aux USA, deux équipes s'engagent également dans l'étude du génome porcin.

- chez les bovins : le nombre d'équipes engagées ou souhaitant s'engager est plus élevé. Un groupe a pris actuellement de l'avance dans la fabrication de sondes. Il comprend une équipe de l'Université du Texas et un Laboratoire privé de Salt Lake City, associés à une équipe de Zurich, Suisse. Une équipe du CSIRO, Australie, est également engagée dans un projet similaire. En Europe, la collaboration est en cours d'organisation sous l'égide de la Société Internationale de Génétique animale. Quinze Laboratoires au moins, dont le groupe formé autour du Laboratoire de Génétique biochimique de Jouy-en-Josas, sont impliqués. Un projet de programme devrait être présenté rapidement à la CEE. La mise en place des groupes en concurrence devrait se structurer dans l'année qui vient.

- chez les ovins : un programme national a été lancé en Nouvelle-Zélande.

Dans cette entreprise, les deux groupes français auront pour objectif de rester aussi compétitifs que possible au sein des ensembles de laboratoires auxquels ils sont associés, tout en mettant d'ailleurs en commun leurs idées et leur savoir-faire. Il est clair que seules joueront un rôle important les équipes qui auront pu être renforcées en personnel scientifique, mais aussi et surtout en ingénieurs et techniciens.

Ces groupes comptent également beaucoup sur le renforcement des collaborations avec

d'autres équipes françaises, notamment celles spécialistes de la carte génétique humaine. Le Laboratoire de Génétique cellulaire de Toulouse organisera d'ailleurs en mai 1991, sous l'égide de la Société française de Génétique, un colloque sur les stratégies d'établissement des cartes génétiques. La préparation de ce colloque et son déroulement devraient faciliter considérablement les rapprochements.

Références bibliographiques

- (Travaux d'analyse du génome effectués chez les porcs et les bovins, classés par rubrique et par ordre chronologique).
- 1 / Cytogénétique**
- FORD C.E., POLLACK D.L., GUSTAVSSON I. (Ed), 1980. Description des bandes chromosomiques des bovins, porcins, caprins. Proceedings of the first international conference for the standardization of banded karyotypes of domestic animals. Reading, août 1976. *Hereditas* 92, 145-162 (participation de Cribiu E.P., Darre M., Echard G., Popescu P.).
- POPESCU C.P., BOSCHER J., TIXIER M., 1983. Une nouvelle translocation réciproque t; rcp (7q-; 15q+) chez un verrat « hypoprolifique ». *Génét. Sél. Evol.*, 15, 479-488.
- POPESCU C.P., BOSCHER J., 1986. A new reciprocal translocation in a hypoproliflic boar. *Génét. Sél. Evol.*, 18, 123-130.
- GUSTAVSSON I. (Coord.), BAHRI I., BOSMA A.A., ECHARD G., FRIES R., HAAN N.A. de, HANSEN E.M., HANSEN K.M., MAKINEN A., POPESCU C.P., RONNE M., SYSA P., TROSHINA A., 1988. Standard karyotype of the domestic pig. *Hereditas*, 109, 151-157.
- BOUVET A., POPESCU C.P., DE GIOVANNI-MACCHI A., COLOMBO G., SUCCI G., 1989. Synaptonemal complexes analysis in a bull carrying a 4:8 Robertsonian translocation. *Ann. Genet.* 32 : 193-199.
- DI BERARDINO D., HAYES H., FRIES R., LONG S., 1989. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. *Cytogenet. Cell Genet.* 43, 65-79. 1990.
- HAYES H., PETIT E., DUTRILLAUX B., 1990. Comparison of RBC-banded karyotypes of cattle, sheep and goat. *Cytogenet. Cell Genet.* (sous presse).
- YERLE M., GALMAN O., ECHARD G., 1990. The high resolution GTG banding pattern of pig chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* (sous presse).
- Il existe désormais un karyotype standard chez le porc et les ruminants domestiques. Les récentes publications de Di Berardino *et al* (1989) et de Hayes *et al* (1990) sont importantes car elles donnent, sur la base des fortes similitudes qui ont été observées entre les karyotypes des bovins, des ovins et des caprins, les correspondances entre tous les chromosomes de ces 3 espèces. Ce résultat permettra de transposer facilement chez les ovins et les caprins les connaissances acquises sur la carte génétique des bovins.
- 2 / Localisation chromosomique de gènes par hybridation *in situ***
- 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 *in situ* hybridization and serological typing. *Ann. Génét.*, 27, 213-219.
- YERLE M., GELLIN J., ECHARD G., LEFEVRE F., GILLOIS M., 1986. Chromosomal localization of leucocyte interferon gene in the pig (*Sus scrofa domestica L.*) by *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 42, 129-132.
- ECHARD G., YERLE M., GELLIN J., DALENS M., GILLOIS M., 1986. Assignment of the major histocompatibility complex to the p1.4-q1.2 region of chromosome 7 in the pig (*Sus scrofa domestica L.*) by *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 41, 126-128.
- POPESCU C.P., COTINOT C., BOSCHER J., KIRSZENBAUM M., 1988. Chromosomal localization of a bovine male specific probe. *Ann. Génét.*, 31, 39-42.
- YERLE M., GELLIN J., 1989. Localization of leucocyte interferon gene in the q2.5 region of pig chromosome 1 by *in situ* hybridization. *Génét. Sél. Evol.*, 21, 249-252.
- GELLIN J., YERLE M., GILLOIS M., 1990. Assignment of nucleotide phosphorylase gene to q21-q22 region of chromosome 7 in the pig, *Sus scrofa domestica L.* *Anim. Genet.* 21, 207-210.
- YERLE M., GELLIN J., DALENS M., GALMAN O., 1990. Localization on pig chromosome 6 of markers GPI, APO E and ENO1 carried by human chromosomes 1 and 19, using *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 54, 86-91.
- Ce dernier travail est un exemple de l'utilisation possible dans une autre espèce, des connaissances sur la carte génétique humaine. Se reporter à la figure 1.
- 3 / Etablissement de liaisons génétiques par études familiales**
- GROSCLAUDE F., JOUDRIER P., et MAHE M-F., 1978. Polymorphisme de la caséine α s2 bovine : étroite liaison du locus α s2-Cn avec les loci α s1-Cn, β -Cn et κ -Cn ; mise en évidence d'une délétion dans le variant α s2-CnD. *Ann. Génét. Sél. anim.*, 10, 313-327.
- GUERIN G., GROSCLAUDE F. et HOULIER G., 1981. The C system of cattle blood groups. 2. Partial genetic map of the system. *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.*, 12, 15-21.
- GROSCLAUDE F., LEFEBVRE J. et NOE G., 1983. Nouvelles précisions sur la carte génétique du système de groupes sanguins B des bovins. *Génét. Sél. Evol.*, 15, 45-54.
- LEVEZIEL H., HINES H.C., 1984. Linkage in cattle between the major histocompatibility complex (BoLA) and the M blood group system. *Génét. Sél. Evol.*, 16, 405-416.
- GEFFROTIN C., CHARDON P., DE ANDRES-CARA D.F., FEIL R., RENARD C., VAIMAN M., 1990. The swine steroid 21-hydroxylase gene (CYP 21) : cloning and mapping within the SLA complex. *Anim. Genet.*, 21, 1-13.
- L'insémination artificielle permettait déjà, chez les bovins, d'accéder à des familles très nombreuses (des centaines de descendants par père). La transplantation embryonnaire offre d'autres possibilités.
- 4 / Etablissement de synténies à l'aide d'hybrides cellulaires**
- GELLIN J., BENNE F., HORS-CAYLA M.C., GILLOIS M., 1980. Carte génétique du porc (*Sus scrofa L.*). I. Etude de deux groupes synténiques G6PD, PGK, HPRT et PK, M2, MPI. *Ann. Genet.*, 23, 15-21.
- GELLIN J., ECHARD G., BENNE F., GILLOIS M., 1981. Pig gene mapping : PKM2-MPI-NP synteny. *Cytogenet. Cell Genet.*, 30, 59-62.
- ECHARD G., GELLIN J., BENNE F., GILLOIS M., 1984. Progress in gene mapping of cattle and pig using somatic cell hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 37, 458-459.
- 5 / Traitement mathématique des données**
- CHEVALET C., CORPET F., 1986. Statistical decision rules concerning synteny or independence between markers. *Cytogenet. Cell Genet.*, 43, 132-139.
- Etude comparée des diverses règles utilisées jusqu'ici et identification de la formule la plus fiable.
- 6 / Synthèses**
- ECHARD G., 1989. The gene map of the pig (*Sus scrofa domestica L.*). *Genetic Maps*, vol. V, O'BRIEN S.J. (Ed.), 4110-4113, Cold Spring Harbor Laboratory.
- ECHARD G., 1989. Domestic animal gene mapping : a comparative map of the species investigated. In HAL-NAN C.R.E. (Ed.), « Cytogenetics of animals », chap.7, 84-94, CAB International.
- 7 / Typage de génotypes à l'aide de sondes**
- LEVEZIEL H., METENIER L., MAHE M.F., CHOPLAIN J., FURET J.P., PABOEUF G., MERCIER J.C., GROSCLAUDE F., 1988. Identification of the two common alleles of the bovine κ -casein locus by the RFLP technique, using the enzyme Hind III. *Génét. Sél. Evol.*, 20, 247-254.
- Ce travail a permis l'application citée en 11. Actuellement le typage se fait par PCR.

8 / Relations entre cytogénétique et caractères d'intérêt économique

POPESCU C.P., BONNEAU M., TIXIER M., BAHRI I., BOSCHER J., 1984. Reciprocal translocations in pigs. Their detection and consequences on animal performance and economic losses. *J. Hered.* 75, 448-452.

Les translocations réciproques ne sont pas rares chez le porc et se traduisent par des baisses sensibles de fertilité.

9 / Relations entre gènes marqueurs et caractères d'intérêt économique

GUERIN G., OLLIVIER L. et SELLIER P., 1978. Note sur les déséquilibres de linkage entre les locus Hal (hyperthermie maligne), PHI et 6-PGD dans deux lignées de Piétrain. *Ann. Génét. Sél. anim.*, 10, 125-129.

GUERIN G., OLLIVIER L. et SELLIER P., 1979. Effet d'entraînement d'un gène sélectionné et déséquilibre de linkage ; l'exemple de deux locus étroitement liés chez le porc, Hal (sensibilité à l'halothane) et PHI (Phosphoglycose isomérase). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 289, 153-156.

GUERIN G., OLLIVIER L. et SELLIER P., 1983. Etude du groupe de liaison Hal, Phi et Pgd chez le Porc ; disposition relative des trois locus et estimation des taux de recombinaison. *Génét. Sél. Evol.*, 15, 55-64.

GUERIN G., RENARD C. et VAIMAN M., 1986. Estimation des taux de recombinaison entre les locus Phi et Pgd et le complexe SLA chez le porc. *Génét. Sél. Evol.*, 18, 241-248.

RENARD C., BIDANEL J.P., PALOVICS A., VAIMAN M., GUERIN G., RUNAVOT J.P., 1988. Relations entre des marqueurs génétiques et les caractères de production chez le porc. *Journées Rech. Porcine en France*, 20, 315-320.

Ce travail a permis l'application citée en 11.

10 / Marqueurs du génome et ressources génétiques

GROSCLAUDE F., AUPETIT R.Y., LEFEBVRE J., MERIAUX J.C., 1990. Essai d'analyse des relations génétiques entre les races bovines françaises à l'aide du polymorphisme biochimique. *Génét. Sél. Evol.*, 22 (sous presse).

L'accès à des sites polymorphes de l'ADN répartis sur l'ensemble des chromosomes permettrait d'approfondir ce type d'études.

11 / Applications en cours sur le terrain

- Chez le porc : élimination du gène de sensibilité au stress (gène Hal) dans les lignées maternelles à l'aide des marqueurs liés (limitation des pertes d'animaux ; application de la rubrique 9).

- Chez les bovins : détermination du génotype au locus de la caseine κ des meilleurs taureaux laitiers français (amélioration de la qualité fromagère des laits ; application de la rubrique 7).

Summary

Genome analysis of farm animal species : establishing the genetic map of pig and cattle.

Gene maps of domestic animal species are still very rudimentary as compared to those of man and mouse. However, many techniques are now available which should permit rapid progress in the establishment of these gene maps. The immediate objective of the INRA research teams in molecular genetics and cytogenetics is to identify for the bovine genome (Jouy-en-Josas) and porcine genome (mainly Toulouse), a range of genetic markers separated by about 20 cM, ie a group of about 150 markers. Taking into account the fact that the organization of the genome is relatively conserved between mammalian species, the information obtained in man and mouse will help, at least in part, to

guide progress of gene mapping in domestic animals. The following results are expected : 1) identification of genome regions implicated in the variability of quantitative traits ; 2) information necessary for cloning genes of interest in animal breeding ; 3) approximate localisation of major genes with respect to neighbouring marker genes ; 4) a better understanding of the genetical diversity in breeds ; 5) a higher precision in the identification of animals and the parentage control. International collaborations are being established, notably within the EEC.

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 (1), 97-105.