

Article original

## Stratégie d'établissement des cartes géniques. Exemple du porc

J Gellin, C Chevalet \*

*Institut national de la recherche agronomique,  
laboratoire de génétique cellulaire de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France*

**Résumé** – La cartographie génétique chez les animaux domestiques consiste d'abord à établir le long du génome un réseau de marqueurs génétiques espacés entre eux de 20 cM et dont certains sont localisés avec précision sur les chromosomes. Parmi les différentes sources de polymorphisme disponibles sur le génome, les microsatellites sont les plus intéressants à utiliser. Ils sont très polymorphes, bien répartis le long du génome et leur étude peut être automatisée. Les connaissances recueillies sur le génome seront intégrées aux analyses quantitatives actuelles grâce à la mise en œuvre de nouveaux concepts d'analyse génétique. Elles permettront une évaluation précoce des génotypes, la mise en évidence de régions du génome intervenant dans la variabilité de caractères quantitatifs ou QTL (*pour quantitative trait loci*), une amélioration des méthodes d'identification des animaux et de vérification des filiations et une appréciation de la diversité génétique des races. L'analyse des parties codantes du génome complète le réseau de marqueurs. Elle permet de comparer les génomes des différents mammifères et en particulier de profiter des informations disponibles sur la carte humaine. Le but final de la cartographie est d'isoler des gènes d'intérêt zootechnique repérés sur le génome.

**génétique animale / cartographie génique / marqueur moléculaire / cytogénétique / porc**

**Summary** – *Gene mapping strategy: the pig as an example. Gene mapping of economically important animal species involves first defining a network of genetic markers evenly spaced along the genome, some of which should be precisely localized on the chromosomes. Of the different sources of polymorphism available on the genome, microsatellites are the most interesting. They are highly polymorphic, spread along the genome and their study can be automated. This knowledge will provide new tools and need the development of new concepts in the fields of quantitative and population genetics. The first expected applications are: an early evaluation of genotypes; the discovery of genome regions involved*

\* Participant au programme de cartographie du porc : le laboratoire de génétique cellulaire à Toulouse, la station de génétique quantitative et appliquée à Jouy-en-Josas, le domaine du Magneraud. Participant également de nombreux autres laboratoires de l'INRA, principalement du département de génétique animale, mais aussi des laboratoires associés du CEA, des laboratoires de l'INSERM et de l'université.

*in the variability of quantitative characters; an improvement of the methods of animal identification and relationship verification; and an estimation of breed genetic diversity. The analysis of the genome coding parts completes this marker network. It allows different mammalian genomes to be compared and information concerning the human map to be used. The final goal is to isolate genes important for animal production.*

**animal genetic / gene mapping / molecular marker / cytogenetics / pig**

## INTRODUCTION

Les développements récents des méthodologies en biologie moléculaire, et l'essor très rapide des travaux sur le génome humain, permettent aujourd'hui d'aborder l'investigation systématique des génomes d'autres organismes. L'élaboration de cartes géniques est devenue une démarche indispensable pour aborder la plupart des problèmes de biologie, que ce soit pour l'amélioration génétique des animaux d'élevage, ou pour des problèmes plus fondamentaux, comme l'évolution et l'étude des maladies humaines.

L'objet d'un programme de cartographie est de déterminer, d'une façon systématique et homogène, mais nécessairement non exhaustive, la position de marqueurs génétiques et de gènes sur les chromosomes de l'espèce, de caractériser le polymorphisme, et *in fine* de déterminer la structure moléculaire des gènes et leur fonction biologique dans l'organisme. Chez les animaux, on peut en attendre un renouvellement des concepts de diversité génétique et de race, de la connaissance du déterminisme héréditaire des caractères polyfactoriels, et des méthodes de gestion des populations, ouvrant la possibilité d'une identification complète des animaux et d'une meilleure maîtrise de caractères actuellement difficiles à sélectionner (facteurs de qualité, résistances génétiques aux maladies).

L'établissement systématique de cartes génétiques des principales espèces animales domestiques a été entreprise depuis quelques années, dans le cadre de programmes de recherches internationaux. Chez les bovins les travaux ont débuté en 1978 (Heuertz et Hors-Cayla, 1978) et une première revue a été publiée par Womack (1984). La dernière version de la carte bovine a été publiée dans la revue *Mammalian Genome* (Fries *et al*, 1993). Depuis 1992, la carte se développe notamment en Europe au sein d'une trentaine de laboratoires regroupés dans le programme Bovmap-Biotechnology (coordination INRA : Levéziel) (Gellin et Levéziel, 1992). Chez le porc, les premiers travaux datent de 1980 (Gellin *et al*, 1980) et les premières revues ont été publiées par Ollivier et Sellier (1982) et Echard (1984). Un «laboratoire sans mur» existe depuis 1991 dans le cadre du projet européen PiGMap-Bridge (coordination AFRC : Archibald) (Archibald *et al*, 1991). Il réunit une douzaine de laboratoires européens, et s'est ouvert en 1993 à des laboratoires américains, australiens et japonais. Enfin, pour le génome aviaire, une collaboration internationale a pris forme en 1992 au cours du congrès de la Société internationale de génétique animale (ISAG).

Plusieurs équipes françaises participent au développement de la cartographie des bovins et des porcins (Gellin et Grosclaude, 1991; Gellin et Levéziel, 1992), tant

en ce qui concerne les travaux de biologie moléculaire (isolement de marqueurs, analyse de liaison, localisation de gènes, typage des populations) que les travaux de génétique quantitative et des populations (dispositifs expérimentaux, analyses statistiques, étude de caractères). Chez les petits ruminants, les équipes abordent l'étude de quelques gènes particuliers. Chez les ovins sont étudiés le gène Booroola intervenant dans la prolificité, le gène ITY intervenant dans la résistance à la salmonellose et la protéine «PrionProtéine» intervenant dans la scrapie. Chez les caprins sont étudiés les gènes intervenant dans l'intersexualité et le débit de traite et les gènes des caséines. Ces équipes participent également au programme international de cartographie du génome ovin, coordonné par la Nouvelle Zélande. En outre, sont engagés de nouveaux programmes de cartographie concernant les génomes de la poule et des salmonidés.

On peut distinguer, dans un programme de cartographie, 3 étapes plus ou moins chevauchantes : 1) la détermination d'un réseau homogène et assez dense de marqueurs génétiques polymorphes ; 2) la localisation des gènes contribuant de façon importante à la variabilité de caractères de production, en utilisant le réseau de marqueurs mis en place ; 3) la caractérisation de gènes fonctionnellement importants pour l'expression et la variabilité des principaux caractères de production.

Par la suite, nous illustrerons cette démarche en nous référant aux travaux concernant le porc.

## PREMIÈRE ÉTAPE : ÉTABLIR UN RÉSEAU DE MARQUEURS

Il s'agit d'établir une carte génique composée de locus marqueurs polymorphes, liés de proche en proche sur l'ensemble du génome de façon homogène et délimitant autant de groupes de liaison que de chromosomes. Des distances génétiques sont définies par le calcul des fréquences de recombinaison entre les différents marqueurs, après détermination du génotype des individus des familles de référence. Les marqueurs devront être distants au plus de 20 centimorgans (cM), pour une longueur totale du génome du porc estimée à environ 25 morgans (Andersson, communication personnelle). On établit simultanément une carte composée de marqueurs localisés sur les chromosomes en utilisant les techniques d'hybridation *in situ*. L'ensemble de ces 2 cartes permet de contrôler la bonne répartition des marqueurs le long du génome et d'analyser la structure du génome par rapport aux cartes humaine et murine.

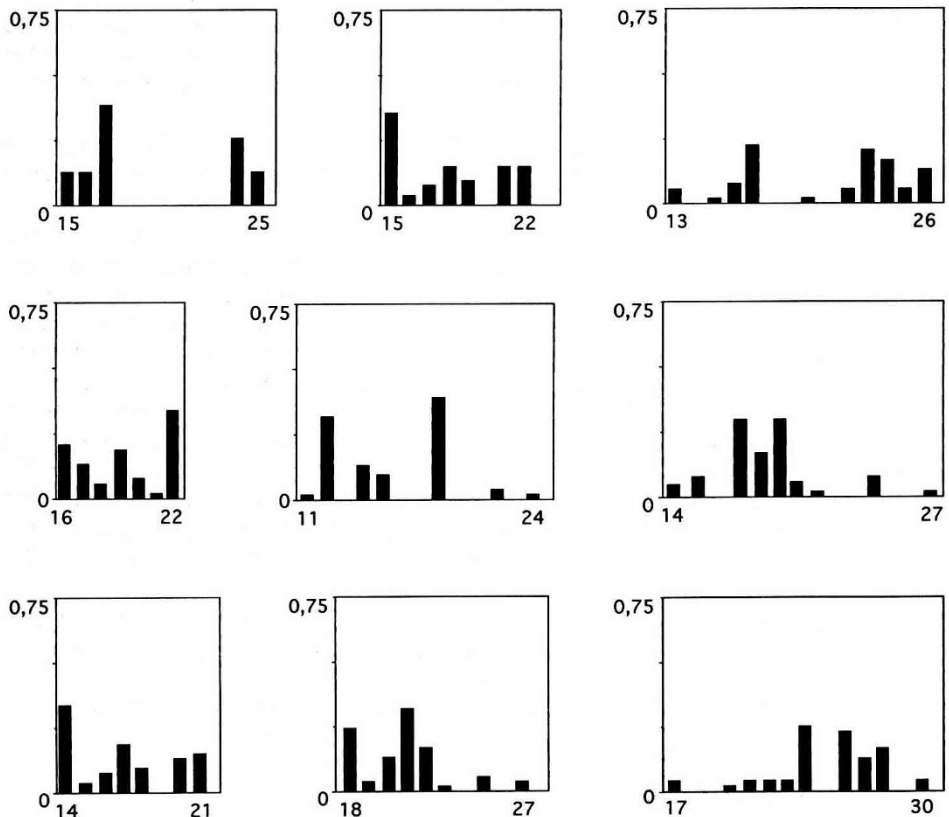
### *Familles de références*

La réalisation du premier réseau de marqueurs dans le projet PiGMaP s'appuie sur une collection d'ADN génomique issue de familles de référence comprenant 26 grands-parents F0, 18 parents F1, et 117 descendants F2 (Archibald *et al*, 1991). Chez le porc, la taille des portées et le rythme de reproduction sont un avantage pour l'analyse des ségrégations. La diversité génétique des races européennes actuelles est relativement réduite, c'est pourquoi les familles de références sont issues de croisements entre porcs européens et porcs chinois ou entre porcs européens et sangliers. Chaque pays producteur d'animaux (Allemagne, Grande-Bretagne, France, Hollande et Suède) a fourni l'ADN des F0, des F1 et de 2 portées F2. En

France, en Grande-Bretagne et en Hollande, les animaux sont issus d'un croisement entre la race Large White et la race chinoise Meishan.

### *Choix d'une classe de marqueurs : les microsatellites*

Parmi les différentes sources de polymorphisme disponibles sur le génome, les microsatellites sont actuellement les marqueurs les plus utilisés. Ce sont des séquences d'ADN formées le plus souvent par la répétition du motif dinucléotidique (TG), dont les propriétés permettent de construire un réseau dense de marqueurs : 1) ils révèlent un grand polymorphisme, les allèles sont nombreux et différent par le nombre de répétitions  $n$  du motif (TG) $n$  (Weber, 1990) (fig 1); ils sont transmis selon les lois de Mendel; 2) ils sont répandus à travers le génome et de façon assez régulière, une estimation faisant état de 65 000 à 100 000 sites dans le génome du



**Fig 1.** Caractérisation de la fréquence des allèles de 9 microsatellites du porc. Exemple des fréquences des allèles de 9 microsatellites sur la population des F0 des familles de référence PiGMaP. Le nombre de répétitions  $n$  du microsatellite (TG) $n$  est indiqué en abscisse. La fréquence de chaque allèle est indiquée en ordonnée.

porc (Winterø *et al.*, 1992); 3) le polymorphisme est étudié avec la technique de la PCR (*polymerase chain reaction*) (Weber et May, 1989; Love *et al.*, 1990). Les amorces nucléotidiques sont choisies de part et d'autre des séquences microsatellites, dans les régions flanquantes spécifiques du locus. Les produits d'amplification obtenus à partir de l'ADN des animaux sont déposés sur un gel de séquence pour l'observation des différents allèles. L'analyse peut être automatisée et envisagée à grande échelle pour des coûts raisonnables : ce type de cartographie est déjà développé au Généthon pour la carte humaine (Weissenbach *et al.*, 1992).

### ***Isolement et localisation des microsatellites***

La localisation chromosomique de microsatellites par hybridation *in situ* (Yerle *et al.*, 1994) est possible à condition qu'ils soient isolés à partir de cosmides (fig 2). Ce procédé est cependant laborieux et la majeure partie des microsatellites a été obtenue à partir d'une banque d'ADN génomique réalisée dans des plasmides. L'ADN adjacent isolé est de l'ordre de 600 pb et cette taille réduite ne permet pas de mettre en œuvre les techniques d'hybridation *in situ*. Les chromosomes porteurs de ces microsatellites sont déterminés par 2 techniques complémentaires : l'hybridation cellulaire et le tri de chromosomes.

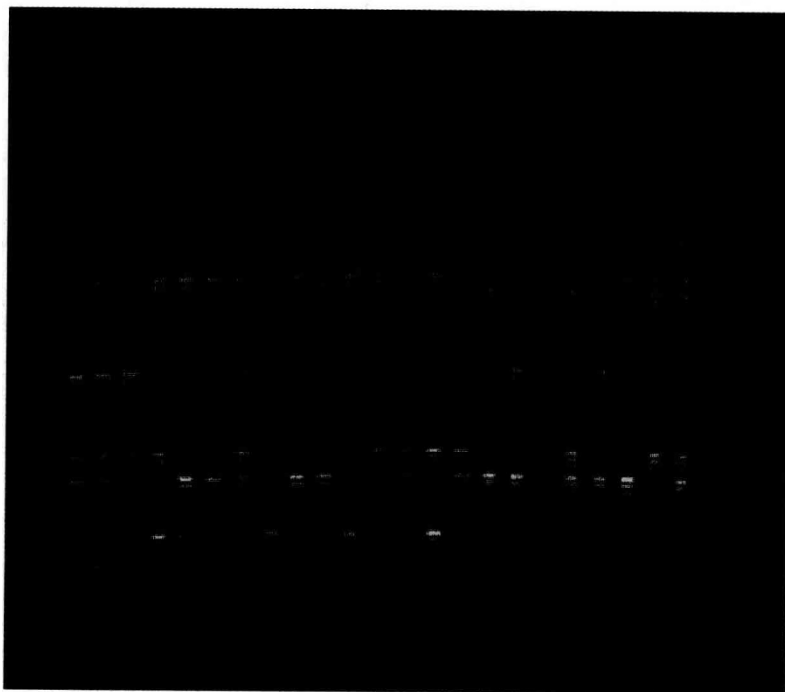
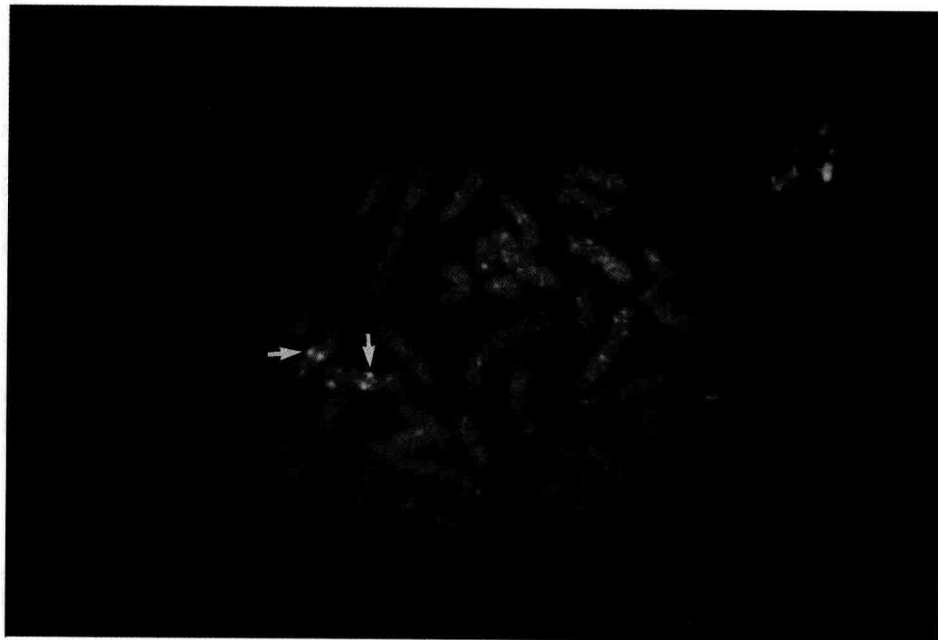
Le panel d'hybrides cellulaires disponible chez le porc demeure incomplet, les caryotypes ne sont pas établis et c'est surtout des synténies (2 gènes situés sur le même chromosome) qui peuvent être recherchées.

Le tri de chromosome en cytométrie de flux sépare les chromosomes du porc (Schmitz *et al.*, 1992), et depuis peu, on connaît l'origine chromosomique de chaque pic du «caryotype en flux». Ce résultat a été obtenu par des expériences d'hybridation *in situ*. L'ADN contenu dans chaque pic est amplifié, marqué par une molécule fluorescente et utilisé comme sonde pour «colorier» dans une métaphase de leucocytes de porc le chromosome correspondant (Milan *et al.*, 1993; Yerle *et al.*, 1993b; Langford *et al.*, 1993). Cette connaissance de l'ensemble du caryotype en flux permet maintenant d'utiliser l'ADN des chromosomes triés pour assigner les marqueurs génétiques isolés et compléter les données de synténie. De plus, l'ADN d'un chromosome particulier isolé par cytométrie de flux, permet de construire des banques d'ADN puis d'isoler des microsatellites spécifiques de ce chromosome. Ce processus est particulièrement intéressant pour isoler des microsatellites à partir des chromosomes pour lesquels peu de marqueurs sont connus.

Chez l'Homme, de très nombreux microsatellites ont été isolés et localisés (Weissenbach *et al.*, 1992). Des couples d'amorces spécifiques de microsatellites humains assignés chez l'Homme peuvent être testés sur de l'ADN de porc. La possibilité d'utiliser dans certaines conditions des microsatellites humains ouvre des perspectives de comparaison des cartes génétiques des 2 espèces.

### ***Typage des animaux***

Les programmes d'étude des cartes génétiques et plus encore la seconde étape de localisation de gènes à effets quantitatifs (QTL) nécessitent la réalisation de nombreux tests génétiques. Nous avons choisi d'utiliser des techniques d'analyse automatique de typage et d'interprétation des résultats. Un séquenceur automatique (Applied



Biosystems) permet la mesure exacte de la longueur, en nombre de paires de bases (pb), des fragments d'ADN amplifiés. Le principe de détection est basé sur l'emploi de molécules fluorescentes couplées aux amorces utilisées pour la PCR. Comme en moyenne la différence de taille entre les allèles extrêmes d'un microsatellite est de l'ordre de 30 à 40 pb et que l'on dispose de 3 types de molécules fluorescentes, il est possible d'analyser dans une même piste jusqu'à 4 ou 5 marqueurs différents avec chaque molécule fluorescente (fig 3).

L'ensemble du processus est contrôlé par l'intermédiaire d'une base de données, développée pour répondre à plusieurs besoins complémentaires : gestion des informations sur les animaux, des stocks d'ADN, des microsatellites et des conditions expérimentales ; aide au choix automatisé des lots d'animaux et de marqueurs analysés simultanément ; reconnaissance automatique des allèles ; vérification de la conformité des résultats avec les généalogies ; exportation de données validées vers les bases de données génétiques.

### *Carte physique : étude de la position des gènes*

Les études de la position des gènes ont été d'abord développées en étudiant des relations de synténies entre gènes grâce aux hybrides cellulaires (Gellin *et al*, 1980). Ensuite, les techniques d'hybridation *in situ* se sont développées avec des sondes d'ADN marqué au tritium (Gellin *et al*, 1985; Yerle *et al*, 1986) puis avec des sondes d'ADN fluorescent (Yerle *et al*, 1992). Cette activité a permis de localiser de nombreux gènes (Andersson *et al*, 1993). Ces résultats mettent en évidence la conservation de portions chromosomiques au travers des espèces (Yerle *et al*, 1990; Mellink *et al*, 1993). Ces points de repères précisent la distribution du premier réseau de marqueurs génétiques et soulignent les zones non encore suffisamment représentées.

---

**Fig 2.** Localisation par hybridation *in situ* d'un ADN cosmétique. Localisation par hybridation *in situ* sur le chromosome 6 de l'ADN d'un cosmide contenant un fragment d'ADN de porc. L'ADN du cosmide marqué par une molécule de biotine s'est hybridé avec l'ADN qui lui est complémentaire à un endroit précis sur les 2 chromosomes homologues. Cette hybridation est ensuite mise en évidence sur la métaphase par une liaison spécifique de la biotine à une molécule fluorescente. (Les 2 flèches indiquent les spots d'hybridation en jaune sur le fond des chromosomes colorés en rouge par l'iodure de propidium.)

**Fig 3.** Gel d'analyse de microsatellites. Chaque colonne de ce gel correspond à l'ADN d'un animal F2. Cet ADN est amplifié en utilisant les amorces spécifiques de 8 microsatellites. Pour chaque locus, une des 2 amorces est liée à une molécule fluorescente. Deux locus peuvent être marqués avec la même molécule fluorescente dès que les tailles des fragments amplifiés peuvent être distinguées sur le gel après l'électrophorèse. Sur ce gel, 3 locus sont révélés en bleu, 3 autres sont révélés en vert et 2 sont révélés en jaune. Pour chaque locus les tailles des fragments amplifiés (ici de 121 à 248 pb) sont mesurées et comparées aux valeurs attendues pour chaque allèle. La fluorescence rouge est utilisée comme marqueur de taille.

### ***État actuel de la carte du porc***

En août 1989, la carte du porc était composée de 48 marqueurs (Echard, 1990). La dernière carte publiée (Andersson *et al*, 1993) fait état de 170 marqueurs, 60 correspondent à des fragments d'ADN anonymes dont une cinquantaine de microsatellites. Des marqueurs sont assignés à tous les chromosomes sauf pour les 2 plus petits, le 17 et le 18 (le porc a 18 paires de chromosomes plus les 2 chromosomes sexuels). Des groupes de liaison ont été assignés aux chromosomes 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 et 15. Douze groupes de liaison ne sont pas encore assignés à un chromosome.

### **DEUXIÈME ÉTAPE : LOCALISATION DE GÈNES À EFFETS QUANTITATIFS (QTL)**

Les cartes génétiques moyennement denses, où 2 marqueurs consécutifs sont à une distance de l'ordre de 20 cM, renouvellent les méthodes qui visent à localiser des QTL. En effet, l'existence d'un réseau de marqueurs, et non plus de marqueurs épars, permet de suivre avec précision la transmission de fragments entiers de chromosomes entre parents et descendants. Malgré une efficacité moindre chez l'animal que chez les plantes, cela accroît sensiblement la puissance des tests statistiques, en limitant le risque de ne pas détecter la ségrégation d'un gène important (Lander et Botstein, 1989; Haley *et al*, 1994).

#### ***Le dispositif expérimental***

Le dispositif expérimental français s'appuie, comme pour la première étape de la cartographie, sur des animaux issus de croisements entre les races Large White et Meishan. Ces 2 races diffèrent pour un grand nombre de caractères d'intérêt économique (Legault et Caritez, 1983; Legault *et al*, 1985; Bidanel *et al*, 1993). Elles présentent chacune des aptitudes potentiellement intéressantes. La race Meishan se caractérise par une faible vitesse de croissance et une forte adiposité de la carcasse, mais une précocité sexuelle et une prolificité supérieures au Large White (Bidanel *et al*, 1989; 1990).

La divergence phénotypique entre ces 2 races permet de se rapprocher d'une situation où des allèles différents sont fixés dans les 2 populations parentales pour chacun des QTL. Dans cette hypothèse et avec les effectifs prévus de 500 produits F2, on doit détecter avec une puissance de 70 à 80% un QTL tel que les allèles correspondant induisent une différence d'environ 0,5 écart type phénotypique. Ces ordres de grandeur permettent d'envisager la recherche de QTL pour des caractères d'héritabilité moyenne (Bidanel, communication personnelle).

#### ***Les caractères étudiés***

Plusieurs groupes de caractères, choisis pour leur importance économique ont été retenus :

- les caractères liés à la croissance des tissus musculaire et adipeux;



- la qualité de la viande : paramètres technologiques et taux d'androsténone, stéroïde contribuant aux odeurs de la viande de mâle entier ;
- la reproduction : fertilité, prolificité, taux d'ovulation, et mécanismes physiologiques de l'établissement de la fonction sexuelle chez les femelles ;
- la réactivité comportementale, neurovégétative et neuroendocrinienne du porcelet ;
- la résistance à la diarrhée néonatale du porcelet ;
- des paramètres hématologiques.

Parallèlement à ces mesures de caractères de production, le nombre de typages à réaliser avec les microsatellites sur les animaux du dispositif expérimental est de l'ordre de 150 000. En effet, certains caractères ne s'expriment que dans un seul sexe et 500 animaux de chaque sexe seront typés pour environ 150 marqueurs.

### TROISIÈME ÉTAPE : L'ACCÈS AUX GÈNES

La troisième étape de la cartographie sera une approche de biologie moléculaire plus ciblée sur des régions restreintes du génome. Les QTL repérés sur le génome devront être encadrés par des marqueurs plus proches afin de mieux suivre leurs ségrégations dans les croisements. Cette activité permettra également de localiser plus finement le gène responsable et à terme de le caractériser et l'isoler. L'utilisation des données d'analyse de séquences, de la physiologie et de la cartographie comparée entre mammifères deviendra essentielle. Au niveau technique, les nouveaux vecteurs de clonage et la recherche systématique de polymorphisme dans l'ADN devront être utilisés. L'analyse des parties codantes du génome correspondant à des fonctions physiologiques sera une bonne méthode pour proposer des gènes candidats pour les QTL.

#### *Isolement des gènes*

Les recherches de marqueurs supplémentaires pourront être concentrées sur les régions où un QTL a été suspecté. Ces précisions sur la position d'un gène serviront de base pour le clonage et l'isolement de ces gènes. En passant de l'utilisation d'un marqueur à la connaissance du gène lui-même, on peut mettre au point un typage plus performant qui supprime les imprécisions liées au pourcentage de recombinaison entre marqueur et QTL. L'analyse de la séquence complète du gène donne la possibilité de répertorier tous les allèles du QTL disponibles pour des actions de sélection. Un exemple est donné avec les gènes des caséines de la chèvre (Martin et Grosclaude, 1993).

L'absence d'information physiologique devient vite un handicap important. Dans le cas du gène de sensibilité à l'halothane par exemple, le processus physiologique responsable du syndrome était bien connu notamment grâce aux informations complémentaires disponibles chez l'Homme. Le gène responsable a été isolé et la mutation causale a été caractérisée. Des preuves doivent s'accumuler pour être sûr que l'on a bien isolé le gène que l'on cherche et constater notamment que la séquence de l'ADN du gène candidat code pour une structure protéique en accord avec la fonction attendue du gène. La cartographie à ce niveau nécessite donc l'intervention des bio-informaticiens qui étudient les séquences d'ADN et des physiologistes.

L'isolement des gènes nécessite l'utilisation de vecteurs capables de cloner de grands fragments d'ADN. Jusque là, les cosmides ayant une capacité de clonage de 45 kb d'ADN ont été utilisés pour la carte du porc, notamment dans la recherche de microsatellites (Ellegren *et al*, 1993, Robic *et al*, 1994). L'utilisation de vecteurs ayant des capacités de clonage plus importante est envisagée. Dans le cadre du consortium européen sur la carte du porc les laboratoires envisagent la préparation d'une banque d'ADN cloné dans des chromosomes artificiels de levure (YAC). Ce système permet de cloner de grands fragments d'ADN de plusieurs centaines de kilobases. Ce type de clone est très utilisé actuellement en cartographie humaine. Cette recherche ciblée de marqueurs et l'utilisation d'ADNc seront associées à une utilisation la plus complète possible du polymorphisme sur l'ADN. Les techniques allant dans ce sens se développent actuellement (Grompe, 1993) .

### **La cartographie comparée**

La notion d'une conservation entre espèces de certains groupes de liaison et de synténie s'est dégagée progressivement. 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 chez les animaux domestiques. La carte comparée constitue un élément important des stratégies de cartographie à mettre en œuvre, même si cette approche a ses limites car la conservation d'éléments génétiques communs à travers les espèces est partielle. Cette démarche peut permettre de trouver rapidement des marqueurs judicieusement distribués le long du génome. L'utilisation la plus importante est de pouvoir désigner pour des QTL ou gènes majeurs un gène candidat déjà repéré dans une zone ayant une équivalence avec un chromosome humain. Quelques comparaisons sont déjà réalisées pour plusieurs chromosomes du porc (Yerle *et al*, 1990; Mellink *et al*, 1993). Cette approche profite des travaux approfondis réalisés sur la carte humaine. L'utilisation chez plusieurs espèces des mêmes locus microsatellites, comme chez l'Homme et le porc, ou mieux chez des espèces proches comme les bovins, ovins ou caprins, permettra de progresser rapidement dans la comparaison des cartes. Une étude systématique de comparaison des cartes peut également être envisagée dans les 3 directions suivantes :

- la fabrication par PCR des sondes spécifiques du porc à partir des informations de séquences recueillies chez l'Homme;
- les expériences d'hybridation *in situ* par «coloriage» spécifique de chromosome pour comparer les génomes des mammifères;
- l'utilisation de banque d'ADN complémentaires (ADNc) correspondant à une fonction physiologique.

### **Fabrication de sondes homologues**

Dans un premier temps, l'utilisation de sondes de gènes localisés chez l'Homme est utile pour créer un premier réseau de comparaison. Tout gène connu peut être potentiellement utilisé. La sonde porcine équivalente peut être fabriquée par PCR à

partir d'amorces «consensus» choisies par comparaison des séquences du gènes dans différentes espèces. Ces gènes sont localisés sur le génome par hybridation *in situ* et peuvent faire l'objet d'une recherche systématique du polymorphisme (Grompe, 1993).

### Coloriage des chromosomes

L'ADN spécifique d'un chromosome humain issu d'une génothèque partielle peut être utilisé comme sonde sur des métaphases de différents singes afin de déterminer des équivalences entre chromosomes (Jauch *et al*, 1992). Des expériences similaires d'hybridation hétérologue sont tentées entre l'ADN humain spécifique d'un chromosome et des chromosomes du porc. Il est sans doute nécessaire dans le cas d'espèces aussi différentes de sélectionner dans l'ADN humain les parties susceptibles de s'hybrider avec l'ADN de porc. Bien que difficiles, ces expériences ont un caractère systématique et permettront de caractériser les régions homologues des chromosomes porcins et humains.

### Utilisation des ADN complémentaires

Les avantages des microsatellites justifient leur utilisation quasi exclusive comme marqueurs pour la cartographie génétique et pour la recherche systématique de QTL dans l'ensemble du génome. Ces marqueurs ont le défaut de ne pas correspondre à des parties codantes de l'ADN. Pour cette raison, il est essentiel d'associer au réseau de microsatellites, «squelette» fondamental de la carte, des marqueurs plus classiques constitués de séquences d'ADN codant pour des gènes qui interviennent dans les mécanismes fondamentaux des organismes ou dans des fonctions spécialisées telles que la reproduction. Cette carte fonctionnelle pourra être reliée à des cartes plus développées comme celle de l'Homme. Des ADNc peuvent être isolés à partir de cellules folliculaires et de cellules nerveuses ou de cellules de glande mammaire. L'isolement de ces gènes est obtenu par des criblages différentiels entre des banques d'ADNc obtenues de cellules plus ou moins engagées dans leur différenciation. Ces marqueurs sont intéressants pour : 1) trouver de nouveaux gènes importants pour la fonction physiologique étudiée ; 2) décrire le polymorphisme et la diversité génétique ; 3) comparer les différents génomes des mammifères (structure du gène, localisation) et proposer ainsi, par cartographie comparée, des gènes candidats pour les QTL.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La première étape de la cartographie génétique apportera un réseau de marqueurs localisés grâce au travail conjoint de plusieurs équipes sur les mêmes familles de référence. Les distances entre marqueurs, calculées sur ces familles, seront ensuite précisées à l'occasion des expériences de localisation de QTL, qui font appel à des effectifs beaucoup plus élevés (5 à 10 fois plus de descendants F2), et progressivement de nouveaux marqueurs seront inclus dans des régions particulières du génome.

Les utilisations des résultats de cartographie vont concerner tant la génétique des populations que la génétique quantitative dans ses aspects appliqués (sélection) et fondamentaux (compréhension du déterminisme génétique des caractères).

### **Identification des allèles de gènes majeurs**

Une des premières attentes de la cartographie est la localisation de gènes majeurs, dont l'existence a déjà été mise en évidence par des analyses statistiques (Le Roy *et al*, 1989). Des exemples de gènes majeurs existent dans plusieurs espèces comme le gène *Rn* de qualité de la viande chez le porc ou le gène Booroola intervenant dans la prolificité des ovins. La description des polymorphismes génétiques permettra d'associer ces gènes à des marqueurs et donc d'identifier le génotype des animaux dès leur naissance. Pour le gène de sensibilité à l'halothane, cette approche a pu être utilisée (Guérin *et al*, 1983) bien avant que le gène lui-même ne soit isolé et que la mutation causale ne soit identifiée (Fujii *et al*, 1991).

### **Introgression**

La caractérisation des génotypes pour un gène majeur permet de concevoir des protocoles d'introgression plus rapides grâce à la caractérisation précoce des génotypes (Hospital et Elsen, 1992). On peut optimiser ces protocoles si, en dehors du locus du gène majeur, on dispose de marqueurs dont les allèles permettent de décider qu'un chromosome provient de la population «donneuse» ou «receveuse» du gène majeur introgressé. Si les taux de sélection le permettent, le choix des individus porteurs de l'allèle favorable au locus majeur peut alors être optimisé pour accélérer aux autre locus le retour vers la structure génétique de la population receveuse (Hospital *et al*, 1992). Il est à noter que cette application ne présuppose pas une association entre marqueurs et gènes à effets quantitatifs, mais seulement la disponibilité de marqueurs répartis assez uniformément sur le génome.

### **Sélection assistée par marqueurs**

L'introgression utilisant des marqueurs est un cas particulier de «sélection assistée par marqueurs». Celle-ci peut être envisagée dans le cadre usuel des protocoles d'évaluation des reproducteurs, si l'on a identifié un marqueur polymorphe étroitement lié à un QTL. La donnée du type allélique reçu au locus marqueur est introduite d'une façon similaire à celles décrivant les niveaux de variation d'un effet d'environnement; l'effet du QTL associé est estimé pour chaque individu, et cette estimation est intégrée dans l'évaluation de la valeur génétique globale (Fernando et Grossman, 1989). Des méthodes plus directes de sélection sur un indice combinant les valeurs phénotypiques et les génotypes en de nombreux marqueurs ont aussi été proposées (Lande et Thomson, 1990), dans la situation où l'on sélectionne une population issue d'un croisement entre 2 races présentant une grande divergence (Chevalet et Boichard, 1992).

La recherche de QTL pour les caractères de reproduction chez le porc apparaît particulièrement intéressante, car les allèles favorables seront pour une grande part apportés par la race Meishan. Inversement, la détermination dans la même expérience, des régions du génome expliquant la supériorité des races

européennes pour les caractères d'engraissement et de composition corporelle notamment, permet d'envisager la mise en œuvre d'un protocole reprenant les principes généraux d'un schéma d'introgession. L'existence de marqueurs délimitant les régions chromosomiques déterminant ces différents caractères permettrait d'envisager la construction d'une race synthétique réunissant les allèles favorables des 2 populations parentales. On peut ainsi imaginer améliorer les performances de reproduction des types génétiques maternels utilisés à l'heure actuelle en Europe, sans dégrader la valeur charcutière de leurs produits croisés.

### ***Caractérisation de la diversité génétique***

La caractérisation génétique des populations permet d'améliorer les méthodes d'identification des animaux, de vérifier les filiations (Hanset, 1975) et de gérer la diversité. Un choix judicieux de quelques marqueurs microsatellites devrait permettre de répondre aux 2 premières applications, malgré une attention particulière à porter au taux de mutation de ce type de marqueur, probablement assez élevé quoique mal connu. Pour la gestion de la diversité, les microsatellites sont utilisés par exemple chez les bovins. Un marqueur idéal pour ce type d'étude devra révéler un grand polymorphisme et présenter malgré tout un taux de mutation bas. Il peut être judicieux d'étudier la partie codante du génome a priori plus représentative de la diversité. Dans ce cas, le polymorphisme disponible peut s'avérer suffisant avec de nouvelles méthodes d'analyses comme la DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) (Myers *et al*, 1987) associée à la PCR. Plus qu'une étude du polymorphisme de marqueurs ou de gènes, un travail au niveau de la structure du génome serait sans doute fructueux. Un certain nombre de groupes de marqueurs polymorphes et liés entre eux peuvent être choisis pour mettre en évidence non seulement des allèles spécifiques dans différentes races mais surtout pour mettre en évidence des haplotypes préférentiels plus ou moins particuliers à chaque race.

La disponibilité de marqueurs génétiques permet de mesurer une diversité génétique dans les populations, et apporte donc à la génétique des populations de nouveaux moyens. Par exemple, les méthodes de contrôle de la variabilité génétique trouveront là des outils nouveaux d'analyse et de gestion (Chevalet, 1992), complémentaires des approches fondées seulement sur des mesures d'apparement calculées d'après les généalogies (Rochambeau et Chevalet, 1985).

Dans les populations naturelles, une application rapide concernera la mesure de flux migratoires. On pourra aussi aborder la recherche de régions du génome, puis de gènes, impliquées dans certains mécanismes de la spéciation. Par exemple l'analyse de croisements entre individus d'espèces proches dans des zones de contact (Vanlerberghe *et al*, 1988) devrait mettre en évidence des associations entre marqueurs et caractères participant au phénomène de dysgenèse hybride (distorsions de ségrégation, détermination du sexe, symétrie bilatérale). On peut aussi penser que l'étude des structures génétiques (gradients de fréquences, déséquilibres de liaison) permettra d'identifier, plus directement, des régions génomiques coadaptées.

## REMERCIEMENTS

Les travaux de cartographie des porcins et des bovins sont financés par l'AIP INRA Agrotech-Prodige, par les programmes Génome et GREG (groupement de recherches et d'études sur les génomes) du ministère de la Recherche et de la Technologie et par la Communauté économique européenne (BRIDGE-PiGMaP et BIOTECH-BovMap).

## RÉFÉRENCES

- Andersson L, Archibald LA, Gellin J, Schook LB (1993) Report of the 1st pig gene mapping workshop (PGMI), 7th August 1992, Interlaken Switzerland. *Anim Genet* 24, 205-216
- Archibald A, Haley CS, Andersson L, Bosma AA, Davies M, Fredholm M, Geldermann H, Gellin J, Groenen M, Gustavsson I, Ollivier L, Tucker EM, Van de Weghe A (1991) PiGMaP : A European initiative to map the porcine genome. Proceedings of the XXII International Conference on Animal Genetics. East Lansing USA. *Anim Genet* 22 (suppl), 82-83
- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM *et al* (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6, 227-235
- Bidanel JP, Caritez JC, Gruand J, Legault C (1993) Growth, carcass and meat quality performance of crossbred pigs with graded proportions of Meishan genes. *Genet Sel Evol* 25, 83-99
- Bidanel JP, Caritez JC, Legault C (1989) Estimation of crossbreeding parameters between Large White and Meishan porcine breeds. I. Reproductive performance. *Genet Sel Evol* 21, 507-526
- Bidanel JP, Caritez JC, Legault C (1990) Estimation of crossbreeding parameters between Large White and Meishan porcine breeds. II. Growth before weaning and growth of females during the growing and reproductive periods. *Genet Sel Evol* 22, 431-445
- Bishop MD, Kappes SM, Keele JW *et al* (1994) A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136, 619-639
- Chevalet C (1992) Utilisation de marqueurs pour la sauvegarde de la variabilité génétique des populations. *Prod Anim* hors série «Éléments de génétique quantitative et application aux populations animales», 295-297
- Chevalet C, Boichard D (1992) Sélection assistée par marqueurs. *Prod Anim* hors série, «Éléments de génétique quantitative et application aux populations animales», 291-294
- Echard G (1984) The gene map of the pig (*Sus scrofa domestica* L). In: *Genetic maps*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 3, 392-395
- Echard G (1990) The gene map of the pig. In: *Genetic maps*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 5, 4110-4113
- Ellegren H, Johansson M, Chowdhary BP *et al* (1993) Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics* 16, 431-436
- Fernando R, Grossman M (1989) Best linear unbiased prediction and marker assisted selection. *Genet Sel Evol* 21, 467-477

- Fries R, Eggen A, Womack J (1993) The bovine genome map. *Mamm Gen* 4, 405-428
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler J, O'Brien PJ, MacLennan DH (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253, 448-451
- Gellin J, Benne F, Hors-Cayla MC, Gillois M (1980) Carte génique du porc (*Sus scrofa* L) I : Etude de 2 groupes synténiques G6PD, PGK, HPRT et PKM2, MPI. *Ann Génét* 23, 15-21
- Gellin J, Echarid G, Yerle M, Dalens M, Chevalet C, Gillois M (1985) Localization of the ( $\alpha$ ) and ( $\beta$ ) casein genes to the q24 region of chromosome 12 in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L) by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 39, 220-223
- Gellin J, Grosclaude F (1991) Analyse du génome des espèces d'élevage : projet d'établissement de la carte génétique du porc et des bovins. *Prod Anim* 4, 97-105
- Gellin J, Levéziel H (1992) Stratégie d'établissement des cartes géniques des espèces d'élevage. *Prod Anim* hors série, «Eléments de génétique quantitative et application aux populations animales», 281-286
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. Review. *Nat Genet* 5, 111-117
- Guérin G, Ollivier L, Sellier P (1983). Étude du groupe de liaison Hal, Phi et Pgd chez le porc : disposition relative des 3 locus et estimation des taux de recombinaison. *Génét Sél Evol* 15, 55-64
- Haley CS, Knott SA, Elsen JM (1994) Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136, 1195-1207
- Hanset R (1975) Probabilité d'exclusion de paternité et de monozygotie, probabilité de similitude. Généralisation à N allèles codominants. *Ann Med Vet* 119, 71-80
- Heuertz S, Hors-Cayla MC (1978) Carte génétique des bovins par la technique d'hybridation cellulaire. Localisation sur le chromosome X de la glucose-6 phosphate déshydrogénase, la phosphoglycérate kinase, l' $\alpha$ -galactosidase A et l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase. *Ann Génét* 21, 197-202
- Hospital F, Chevalet C, Mulsant P (1992) Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132, 1199-1210
- Hospital F, Elsen JM (1992) Introgression génique assistée par marqueurs. *Prod Anim* hors série «Eléments de génétique quantitative et application aux populations animales», 299-302
- Jauch A, Wienberg J, Stanyon R *et al* (1989) Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 8611-8615
- Lande R, Thompson R (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743-756
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 124, 185-199
- Langford CF, Telenius H, Miller NGA, Thomsen PD, Tucker EM (1993) Preparation of chromosome-specific paints and complete assignment of chromosomes in the pig flow karyotype. *Anim Genet* 24, 261-267
- Le Roy P, Elsen JM, Knott SA (1989) Comparison of four statistical methods for detection of a major gene in a progeny test design. *Génét Sél Evol* 21, 341-357

- Legault C, Caritez JC (1983) L'expérimentation sur le porc chinois en France. I. Performances de reproduction en race pure et en croisement. *Génét Sél Evol* 15, 225-240
- Legault C, Sellier P, Caritez JC, Dando P, Gruand J (1985) L'expérimentation sur le porc chinois en France. I. Performances de production en croisement avec les races européennes. *Génét Sél Evol* 17, 133-152
- Love J, Knight A, Mcaleer M, Todd J (1990) Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Res* 18, 4123-4130
- Martin P, Grosclaude F (1993) Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livestock Prod Sci* 35, 95-115
- Mellink C, Lahbib-Mansais Y, Yerle M, Gellin J (1993) Localization of four new markers to pig chromosomes 1, 6, and 14 by radioactive *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 64, 256-260
- Milan D, Yerle M, Schmitz A, Chaput B, Vaiman M, Frelat G, Gellin J (1993) A PCR based method to amplify DNA with random primers: determining the chromosomal content of porcine flow-karyotype peaks by chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 62, 139-141
- Myers RM, Maniatis T, Lerman L S (1987) *Methods Enzymol* 155, 501-527
- Ollivier L, Sellier P (1982) Pig genetics: a review. *Ann Génét Sél Anim* 14, 481-544
- Robic A, Dubois C, Milan D, Gellin J (1994) A rapid method to isolate microsatellite markers from cosmid clones. (à paraître dans *Mammalian Genome* vol 5)
- Rochambeau H de, Chevalet C (1985) Minimisation des coefficients de consanguinité dans les petites populations d'animaux domestiques. *Génét Sél Evol* 17, 459-480
- Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW (1994) A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136, 231-245
- Schmitz A, Chaput B, Fouchet P, Guilly MN, Frelat G, Vaiman M (1992) Swine chromosomal DNA quantification by bivariate flow karyotyping and karyotype interpretation. *Cytometry* 13, 703-710
- Vanlergerghe F, Boursot P, Catalan J, Gerasimov S, Bonhomme F (1988) Analyse génétique de la zone d'hybridation entre 2 sous-espèces de souris *Mus musculus domesticus* et *Mus musculus musculus*. *Genome* 30, 427-437
- Weber J (1990) Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7, 524-530
- Weber J, May P (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44, 388-396
- Weissenbach J, Gyapar G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992) A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359, 794-801
- Womack JE (1984) Gene map of the cow (*Bos taurus*, 2N=60). In: *Genetic maps* Cold Spring Harbor Laboratory Press 3, 401
- WinterøAK, Fredholm M, Thomsen PD (1992) Variable (dG-dT)n.(dC-dA)n Sequences in the porcine genome. *Genomics* 12, 281-288
- Yerle M, Galman O, Lahbib-Mansais Y, Gellin J (1992) Localization of the pig luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) by radioactive and non-radioactive *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 59, 48-51



Yerle M, Gellin J, Dalens M, Galman O (1990) Localization on pig chromosome 6 of markers GPI, APOE, and EN01, carried by human chromosomes 1 and 19, using *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 54, 86-91

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

Yerle M, Gouveau A, Gellin J, Le Tissier P, Moran C (1994) Rapid mapping of cosmid clones on pig chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Mamm Genome* 5, 34-37

Yerle M, Schmitz A, Milan D, Chaput B, Monteagudo L, Vaiman M, Frelat G, Gellin J (1993b) Accurate characterization of porcine bivariate flow karyotype by PCR and fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 16, 97-103