

G3609

PERSPECTIVES D'APPLICATIONS DU GÉNIE GÉNÉTIQUE EN SÉLECTION PORCINE

P. MULSANT, M. DALENS, Geneviève ECHARD, J. GELLIN, Martine YERLE, M. GILLOIS

I.N.R.A. - Laboratoire de Génétique Cellulaire - B.P. 27, 31326 CASTANET Cedex

INTRODUCTION

L'amélioration génétique des animaux domestiques s'est largement basée sur l'étude statistique de caractères multifactoriels. Le génie génétique, en permettant le clonage et la multiplication végétative de gènes ou de fragments de gènes, les individualise et aboutit ainsi à une approche fondamentalement différente de la génétique animale, car l'on ne pourra étudier que des gènes isolés.

Une fois purifiée par génie génétique, une séquence d'ADN peut être utilisée pour l'analyse ou la modification du génome des animaux domestiques:

- (1) d'une part, elle est une sonde spécifique capable de reconnaître des séquences homologues dans des préparations d'ADN ou sur des chromosomes, ce qui conduit à la localisation des locus correspondants sur les chromosomes de l'espèce étudiée et à la mise en évidence de polymorphismes de ces séquences homologues dans une population animale ;
- (2) d'autre part, un gène cloné, intact ou modifié *in vitro*, peut être introduit dans un hôte approprié – cellule en culture ou embryon – et des lignées cellulaires recombinées ou des animaux « transgéniques » porteurs d'un tel gène ont ainsi été obtenus.

Nous rappellerons rapidement les principales méthodologies d'isolement et de caractérisation de gènes, les techniques d'analyse du génome par des sondes d'ADN cloné et les méthodes de transfert de gènes dans des cellules ou des embryons, puis nous exposerons certaines applications possibles de l'ensemble de ces méthodes à la génétique du porc.

Les résultats déjà obtenus, notamment chez l'homme (carte génique) et la souris (animaux transgéniques), incitent à penser que ces méthodes auront également un impact important chez le porc. On peut prévoir en particulier une augmentation rapide du nombre de marqueurs génétiques polymorphes à localisation chromosomique définie, l'isolement et la caractérisation de gènes majeurs d'intérêt zootechnique, enfin le transfert, intra ou interspécifique, de certains de ces gènes dans des embryons afin d'obtenir des animaux améliorés.

MÉTHODOLOGIES

a) Clonage

L'outil de base du génie génétique est constitué par une famille d'enzymes, appelées endonucléases de restriction – ou enzymes de restriction – qui ont la propriété de reconnaître de courtes

séquences spécifiques de 4 à 6 paires de nucléotides et d'y couper la molécule d'ADN. L'emploi raisonné de ces enzymes permet d'insérer dans des vecteurs bactériens capables de multiplication autonome, plasmides ou phages, des fragments d'ADN provenant d'un organisme quelconque et de fabriquer ainsi des molécules recombinantes. Après transformation d'une population bactérienne, on obtient une série de colonies dont chacune contient un très grand nombre de copies d'UNE SEULE de ces molécules recombinantes. L'isolement et la multiplication d'une de ces colonies correspondent donc au clonage et à la multiplication du fragment d'ADN inséré.

Suivant le vecteur utilisé, la longueur des séquences clonées peut varier de quelques centaines de paires de bases (pb) jusqu'à plus de cinquante mille paires de bases (50 kilobases, kb). Les séquences intégrées peuvent être des fragments d'ADN total (génomique), ou des copies artificielles d'ARNs messagers (ADNc). Suivant l'ADN utilisé lors du clonage, on disposera ainsi de banques de gènes – ou plus précisément de fragments d'ADN – appelées génothèques, correspondant à l'ensemble du génome ou à une partie de celui-ci, par exemple les gènes exprimés dans un type de cellule ou d'organe déterminé ou bien les gènes situés sur un chromosome particulier.

b) Tri

Le principe du clonage fait que l'activité fonctionnelle du gène qui correspond à une séquence clonée est souvent inconnue. Cependant il est parfois possible de trier dans une génothèque les clones recombinants qui portent un fragment d'un gène donné. Cela peut en particulier être le cas quand on dispose d'anticorps contre la protéine correspondante, quand on connaît la séquence de cette protéine ou quand un fragment du gène homologue d'une espèce proche a déjà été cloné.

c) Reconnaissance de séquences par hybridation moléculaire

Une molécule d'ADN préalablement dénaturée est capable de reconnaître spécifiquement des séquences présentant une forte homologie et de s'y renaturer. Une séquence d'ADN clonée peut donc servir de sonde spécifique qui mettra en évidence les séquences qu'elle reconnaît, soit sur des préparations d'ADN, soit sur des chromosomes mitotiques.

« Southern »

Une enzyme de restriction découpe l'ADN d'une espèce en fragments reproductibles, grâce à ses sites spécifiques de reconnaissance. La taille et le nombre de ces fragments ne dépendront que de la position dans l'ADN traité de ces sites de reconnaissance. Une électrophorèse sur gel séparera ensuite les fragments obtenus suivant leur taille. Après transfert sur un filtre de nitrocellulose (SOUTHERN, 1975), et hybridation moléculaire avec une sonde marquée – en général radioactive – les fragments homologues d'une sonde sont détectés par une méthode de révélation, le plus souvent une autoradiographie. Etant donné que le nombre de sites de coupure et les distances entre sites seront différents d'un gène à l'autre, chaque gène aura ainsi une « image de restriction » caractéristique. En utilisant une gamme d'enzymes de restriction, on obtiendra une gamme d'images du gène étudié (RENARD *et al.*, ces Journées).

« Hybridation in situ »

Le même phénomène de reconnaissance spécifique fait qu'une sonde marquée d'ADN cloné se réassociera préférentiellement avec les séquences homologues présentes sur des chromosomes mitotiques (en général métaphasiques). On observera cependant que, s'agissant de gènes uniques ou faiblement répétés, le petit nombre de sites par cellule conduit à un rapport signal spécifique sur bruit de fond assez faible, ce qui rend la méthode assez délicate.

« Tri de chromosomes »

Une méthode intermédiaire consiste à rechercher un signal d'hybridation entre une sonde marquée et des chromosomes séparés par un trieur de cellules (la séparation par électrophorèse de chromosomes de levure a été publiée. L'extension aux mammifères reste à faire).

d) Transfert de gènes dans des cellules animales en culture

Dans la mesure où l'on s'intéresse au fonctionnement d'un gène après transfert dans une cellule hôte, il devient nécessaire de n'employer que des gènes fonctionnels et donc complets. En contrepartie, ceux-ci peuvent avoir été construits *in vitro* par l'assemblage d'éléments structurels et régulateurs d'origines diverses.

De très nombreuses techniques de transfert ont été utilisées, qui peuvent être classées en trois grandes familles:

(1) des techniques « en masse » (coprécipitation, fusion avec des protoplastes ou des liposomes, électroporation) où un grand nombre de copies du gène exogène pénètre dans une fraction plus ou moins importante de la population cellulaire traitée,

(2) une technique biologique, plus sélective, qui utilise des rétrovirus défectifs comme vecteurs,

(3) enfin la microinjection dans le cytoplasme ou mieux le noyau d'un nombre forcément restreint de cellules sélectionnées par l'expérimentateur.

Les techniques « en masse », beaucoup plus simples, ont cependant l'inconvénient d'avoir des pourcentages de réussite très faibles (entre 2×10^{-3} et 10^{-6}) et donc de nécessiter l'emploi simultané d'un système de sélection.

Quelle que soit la technique de transfert, les clones de cellules transfectées obtenus présentent des caractéristiques communes :

- l'intégration du gène étranger dans les chromosomes cellulaires n'est pas systématique, ce qui se traduit par une instabilité de certains clones;
- quand il y a eu intégration, le site chromosomique d'insertion varie de cellule à cellule et l'intégration homologue paraît être un événement très rare (de l'ordre de 1 pour 1000 intégrations totales);
- dans un clone donné, il peut s'être passé un ou plusieurs événements d'intégration avec un nombre variable, souvent important, de copies intégrées en tandem en un même site, dont une partie seulement est fonctionnelle (par contre, le transfert par rétrovirus aboutit le plus souvent à l'intégration d'une seule copie par site);
- Enfin, quand il s'agit de gènes à expression organo-dépendante, la régulation de ces gènes dans les cellules transfectées est souvent anormale.

e) Transfert de gènes dans des embryons

A cause du nombre toujours limité d'embryons disponibles, les techniques de transfert « en masse » n'ont pas pu être employées et la seule technique efficace à ce jour est la microinjection de l'ADN étranger dans le pronucleus mâle d'œufs fécondés. L'infection d'embryons au stade blastocyste par des rétrovirus fait penser que des rétrovirus défectifs pourront bientôt servir de vecteurs de transfert.

L'animal de choix a été la souris, avec des résultats très prometteurs en quelques années (PALMITER et BRINSTER, 1985):

- Le taux apparent de réussite est très important, puisque, parmi les souriceaux nés, de 1 % à près de 30 %, suivant les expériences, se sont révélés recombinants. Ce taux est à corriger par la mortalité embryonnaire due à la procédure expérimentale.
- Comme les cellules recombinantes, les animaux transgéniques ont intégré un nombre variable de copies du gène étranger, en un ou plusieurs sites atypiques. L'intégration est donc également non-homologue, ce qui limite l'application de ce procédé à des gènes dominants ou codominants, puisque les gènes « indigènes » subsistent.
- Le transfert interspécifique est possible, des souris « géantes » étant nées après introduction de gènes modifiés d'hormone de croissance d'homme ou de rat.
- La présence de ces copies intégrées dans le génome des cellules de la lignée germinale de ces animaux se traduit par une transmission à leur descendance identique à celle d'un caractère mendélien monogénique.

- En revanche, l'expression des gènes transférés reste mal contrôlée, notamment quand ils ont été modifiés *in vitro* avant transfert. En particulier, les niveaux d'expression ne correspondent pas au nombre de copies intégrées par cellule.

Un aménagement de la technique de microinjection, permettant son application à d'autres animaux que la souris et en particulier au porc, vient d'être publié par les groupes pionniers de Brinster et Palmiter (HAMMER *et al.*, 1985).

Une autre procédure, qui n'a été réalisée que chez la souris, consiste à isoler dans un premier temps des cellules embryonnaires totipotentes, éventuellement à les modifier par mutagenèse, transfert de gènes ou fusion, puis à les réintroduire dans des embryons receveurs. Cette méthode permettrait de trier les meilleurs recombinants parmi des cellules en culture avant leur réintroduction.

PERSPECTIVES

a) Carte génique

1. A un locus donné, l'image électrophorétique, après découpage par une enzyme de restriction et révélation par hybridation moléculaire avec une sonde homologue, diffère le plus souvent d'une espèce à une autre. L'analyse des images d'une collection d'hybrides interspécifiques Porc × Rongeur – où les chromosomes du porc ont ségrégué de façon aléatoire – permet de conclure à la présence ou à l'absence, dans ces hybrides, des séquences porcines reconnues par la sonde. La comparaison de la ségrégation de ces séquences porcines avec celle d'autres gènes ou de chromosomes permet d'inclure ces séquences dans des groupes de synténie ou de les assigner à des chromosomes.

L'hybridation d'une sonde avec des chromosomes de porc séparés par trieur de cellules aboutit au même résultat. L'hybridation *in situ* fournit par ailleurs la localisation précise des séquences homologues de cette sonde.

On notera que, suivant la sonde choisie, on assigne ainsi soit un gène connu, soit une séquence qui n'est définie, arbitrairement, que par le nom de la sonde. Le nombre de marqueurs potentiels est donc immense. D'autre part, en modifiant les conditions expérimentales, des sondes provenant d'une autre espèce que le porc ont pu être utilisées.

2. Des changements de nucléotides dans un site de reconnaissance d'une enzyme de restriction, ou des insertions ou délétions de séquences suffisamment longues entre deux sites modifient l'image d'un gène après « Southern ». Un polymorphisme de cette image dans une population animale y révèle en fait un polymorphisme des séquences d'ADN mises en évidence, dit polymorphisme de fragments de restriction.

Comme un grand nombre d'enzymes de restriction ayant des sites de reconnaissance différents sont disponibles dans le commerce, on s'attend à détecter par cette méthode un très grand nombre de polymorphismes ; des valeurs atteignant $3 \cdot 10^5$ ont été publiées.

Les allèles définis par analyse de fragments de restriction ont plusieurs caractéristiques importantes, outre leur nombre potentiellement illimité :

- (a) ils se comportent comme des marqueurs codominants et constitutifs, ce qui élimine tout problème d'expression phénotypique,
- (b) le polymorphisme peut être situé dans une région codante ou une région de contrôle d'un gène, ce qui devrait permettre de détecter des variations de sa régulation.
- (c) ces allèles sont mis en évidence par une seule et même méthode de détection, dont l'application est universelle, puisqu'elle sert également à la cartographie des gènes correspondants.

3. On peut donc définir une stratégie simple et à relativement court terme de cartographie des gènes du porc, où un nombre important de sondes servirait d'abord à marquer chaque chromosome, puis à « saturer » des segments chromosomiques, considérés comme importants, par des marqueurs génétiques présentant des polymorphismes de fragments de restriction (RUDDLE,

1981). Cette stratégie s'est révélée extraordinairement efficace chez l'homme : au VIII^e International Workshop on Human Gene Mapping, de 1985 à Helsinki, plus de 900 gènes clonés étaient localisés (dont 249 ont une fonction connue), contre une cinquantaine, dont 16 de fonction connue, seulement 4 ans auparavant ; un polymorphisme de fragments de restriction avait déjà été mis en évidence à 50 % de ces locus. Même s'il est certain que la carte du porc progressera moins vite dans l'absolu, étant donné le nombre encore restreint d'équipes qui y travaillent, une extension rapide est cependant prévisible. Elle sera d'autant plus intéressante que le porc est une des espèces où la carte est la moins développée et qu'il subsiste encore de nombreuses incertitudes concernant la localisation précise de certains gènes marqueurs ou la liaison entre ces gènes et des marqueurs de référence. A ce jour, seuls les gènes de l'interféron Alpha et du SLA ont été localisés par hybridation avec les sondes correspondantes, respectivement sur les chromosomes 1 et 7. Nous préparons en ce moment une collection de sondes anonymes destinées dans une première étape au marquage systématique de chacun des chromosomes du porc. La création de collections de ce type est une nécessité dans la mesure où il n'existe encore « sur le marché » que très peu de sondes de porc qui soient caractérisées.

b) « Kits de diagnostic »

1. La première application envisageable est d'utiliser un jeu de sondes d'ADN qui correspondent à un segment chromosomique sur lequel se trouve un gène majeur important pour étudier la transmission de ce segment chromosomique et connaître le génotype d'animaux reproducteurs au locus de ce gène majeur, de la même manière qu'un typage aux locus GPI et PGD fournit des indications sur les allèles présents au locus de sensibilité à l'halothane. Ce travail sera facilité par l'isolement de sondes à partir de génothèques « régionales », à partir d'un seul chromosome du porc, ou mieux une région d'un chromosome. Les techniques nécessaires (tri physique de chromosomes, hybrides somatiques « monoporteurs » ne conservant qu'un seul chromosome et microdissection de chromosomes métaphasiques) sont à peu près au point chez l'homme. Leur application au porc commence.

Comme les allèles qu'une sonde permet de définir sont dominants et constitutifs, cette méthode d'identification de génotypes sera d'autant plus intéressante que l'expression du gène majeur correspondant sera difficile à étudier (expression dans un seul sexe ou limitée à une partie de la vie de l'animal...).

2. Certaines variantes de cette méthode sont déjà en partie opérationnelles chez l'homme et pourraient être envisagées dans les espèces domestiques :

- Le sexage par une sonde spécifique du chromosome Y permet la détermination précoce du sexe d'embryons (ce qui sera surtout intéressant si le transfert d'embryons se développe) et l'étude fine d'anomalies du développement sexuel.
- Certaines sondes ont la propriété de reconnaître un grand nombre de séquences sur des chromosomes différents. L'usage de telles sondes pour mettre en évidence des anomalies chromosomiques, voire pour des tests de paternité, a été suggéré. Il semble que pour le moment ces méthodes ne sont pas compétitives avec les méthodes actuelles de diagnostic (caryotypes, tests immunologiques,...).

c) Isolement de gènes majeurs

Une stratégie permettant d'aboutir à l'isolement d'un gène dont le produit est inconnu avait été définie par RUDDLE, 1984. La démonstration pratique vient d'en être donnée, une fois encore chez l'homme, avec l'isolement de sondes correspondant au locus de la maladie de Duchenne. La procédure est complexe, elle consiste schématiquement à se rapprocher de plus en plus du gène, à partir de marqueurs liés, par changements d'échelle successifs. La difficulté tient à ce qu'il faut passer de quelques centimorgans, soit quelques dizaines de millions de paires de bases, à quelques centaines de paires de bases. Un tel travail peut être entrepris dès maintenant sur le gène Hal^S de sensibilité à l'halothane, en partant du gène lié GPI.

Par ailleurs les équivalents porcins de gènes « intéressants » déjà clonés dans d'autres espèces pourront être isolés à partir de génothèques de porc, chaque fois que les séquences seront suffisamment proches pour être reconnues par les sondes disponibles.

Une fois un gène cloné, son fonctionnement pourra être étudié par transfert dans des lignées cellulaires, voire des embryons d'espèces modèles.

d) Animaux transgéniques

En théorie, n'importe quel gène FONCTIONNEL, dominant ou codominant, peut être introduit dans un embryon ; ce gène peut être naturel ou avoir été mis sous la dépendance de séquences de contrôle différentes ; enfin, le transfert interspécifique est possible. Les possibilités de création d'animaux nouveaux sont donc immenses, comme l'est notre ignorance des régulations dans l'expression des gènes transférés. Les taux de réussite rapportés au nombre d'embryons manipulés ne sont pas très élevés. Aussi considérerons-nous que les animaux transgéniques sont pour le moment des animaux de laboratoire et n'évoquerons-nous que quelques principes très généraux d'expérimentation en la matière :

- Transferts de gènes « favorables ». Il nécessite que l'on connaisse les principaux gènes qui interviennent dans le contrôle génétique et moléculaire des grandes fonctions physiologiques, reproduction, nutrition, croissance... C'est sans doute pourquoi les premières expériences, après des essais sur des gènes présumés neutres, ont porté sur les gènes de l'hormone de croissance ou de son facteur de libération. Les résultats, spectaculaires chez la souris (PALMITER *et al.*, 1982), le seraient beaucoup moins sur le porc (HAMMER *et al.*, 1985).
- Transfert de gènes « anti-sens », dont le produit a une séquence complémentaire de celui d'un gène défavorable, afin d'inhiber le fonctionnement de ce dernier.
- Transfert en tandem d'un gène « favorable » et d'un gène de criblage rapide, de coloration par exemple, permettant la détection automatique des animaux porteurs.
- Transfert d'un gène normal, mais dont les séquences régulatrices ont été modifiées de façon à contrôler son expression.

Les expériences de transfert de gènes chez la souris ont mis en évidence un certain nombre de problèmes importants pour lesquels il n'existe sans doute pas de réponse universelle : expression du gène dans des tissus ou des types cellulaires où il ne fonctionne pas normalement, création de « mutations létales » dues à l'insertion en un site illégitime, stabilité des séquences insérées au cours des générations successives.... En contrepartie, ce procédé a l'énorme avantage théorique de ne pas modifier le génome en dehors de la zone d'insertion.

CONCLUSION

Le génie génétique représente un outil récent et les techniques qui lui sont associées progressent très rapidement. Si les applications à court terme sont relativement claires, en particulier en matière de carte génique, les perspectives à long terme le sont moins et se dégageront au fur et à mesure que l'expérimentation avancera. Par exemple, pour être généralisées, les procédures de typage par des jeux de sondes ont encore besoin d'être simplifiées (BECKMANN et SOLLER, 1983) : l'étape d'extraction de l'ADN reste longue et des méthodes de révélation non-radioactives sont sans doute préférables pour les analyses de routine. On signalera cependant que plusieurs firmes de génie génétique préparent d'ores et déjà la commercialisation de kits de diagnostic de maladies héréditaires humaines par des sondes d'ADN (mais ces maladies sont un ensemble de caractères monogéniques sans équivalent chez les animaux domestiques, par suite de la sélection). De même, le développement de procédés de transfert génique moins drastiques que la microinjection dans des œufs fécondés conduirait rapidement à la naissance d'un grand nombre de porcs transgéniques. La création rationnelle de ces animaux supposera toutefois que soient mieux connus les gènes qui ont un rôle majeur dans la régulation des principales fonctions physiologiques du porc.

BIBLIOGRAPHIE

- BECKMANN J.S., SOLLER M., 1983. *Theor. Appl. Genet.*, **67**, 35-43.
- Eighth Int. Hum. Gene Mapping Workshop, Helsinki, Finland, 4-10 August 1985. *Cytogenet. Cell Genet.*, **40**, sous presse.
- HAMMER R.E., PURSEL V.G., REXROAD C.E. Jr., WALL R.J., BOLT D.J., EBERT K.M., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1985. *Nature*, **315**, 680-683.
- PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBAUER M.E., ROSENFELD M.G., BIRNBERG N.C., EVANS R.M., 1982. *Nature*, **300**, 611-615.
- PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1985. *Cell*, **41**, 343-345.
- RUDDLE F.H., 1981. *Nature*, **294**, 115-120.
- RUDDLE F.H., 1984. *Am. J. Hum. Genet.*, **36**, 944-953.
- SOUTHERN E.M., 1975. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.