

Identification du gène RN à effet majeur sur la qualité de la viande chez le porc

D. MILAN (1), L. ANDERSSON (2), C. LOOFT (3), Valérie AMARGER (2), Annie ROBIC (1), Claire ROGEL-GAILLARD (4), Nathalie IANNUCELLI (1), J.-C. CARITEZ (5), Martine YERLE (1), J. GELLIN (1), J.-M. ELSEN (6), P. CHARDON (4), Pascale LE ROY (7)

- (1) INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire - BP 27 - 31326 Castanet-Tolosan Cedex
(2) Swedish University of Agricultural Sciences - Box 7070, SE 750 07 Uppsala, Suède
(3) Christian Albrechts University, Institute of Animal Breeding and Husbandry - 24118 Kiel, Allemagne
(4) INRA - CEA, Laboratoire de Radiobiologie et d'Étude du Génome - 78352 Jouy-en-Josas Cedex
(5) INRA, Unité de Génétique Animale - Domaine du Magneraud, BP 52, 17700 Surgères
(6) INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux - BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex
(7) INRA, Station de Génétique Quantitative et Appliquée - 78352 Jouy-en-Josas Cedex

Identification du gène RN à effet majeur sur la qualité de la viande chez le porc

Cette communication présente les différentes étapes ayant permis l'identification du gène RN par "clonage positionnel". Soit : 1° la constitution de familles informatives et l'analyse de marqueurs génétiques couvrant le génome ayant permis de cartographier le gène RN sur le chromosome 15 – 2° la cartographie génétique fine de cette région – 3° la cartographie cytogénétique de marqueurs proches – 4° les études de carte comparée permettant de déterminer la position de RN chez l'homme – 5° le développement de cartes d'irradiation de la région de RN chez le porc et chez l'homme – 6° le développement d'un contig de BAC couvrant près de 2 Mb – 7° le développement d'une carte du déséquilibre de liaison de la région de RN chez le porc – 8° le séquençage d'un clone BAC contenant les marqueurs en déséquilibre de liaison total – 9° l'identification d'un gène encore inconnu membre d'une famille de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique de la cellule musculaire – 10° l'identification d'une mutation de ce gène rencontrée exclusivement chez tous les animaux porteurs de la mutation RN-.

Identification of the RN major gene influencing quality of pig meat

We present here the different steps that allowed us to identify the RN gene by a positional cloning approach : 1° development of informative families and analysis of genetic markers covering the genome to map RN on chromosome 15 – 2° regional linkage mapping of RN gene – 3° cytogenetic mapping of close markers – 4° comparative mapping studies to identify RN location on human genome – 5° development of radiation hybrid maps of RN region in pig and human – 6° development of a BAC contig covering more than 2 Mb – 7° development of a porcine linkage disequilibrium map of RN region – 8° sequencing of a BAC containing the markers in total linkage disequilibrium – 9° identification of a new member of a gene family involved in the regulation of energy metabolism – 10° identification of a mutation totally and exclusively found in animals carrying RN- allele.

INTRODUCTION

En 1985, un travail mené sur l'étude des "viandes acides" montrait que les animaux atteints présentaient une augmentation de la quantité de glycogène musculaire, induisant une diminution du rendement technologique à la cuisson. Ce syndrome fut appelé " effet Hampshire " car il était caractéristique de cette race (MONIN et SELLIER, 1985). Confronté à ce problème dans les lignées de la firme de sélection Pen ar Lan, NAVEAU (1986) suggérait pour expliquer ce défaut l'existence d'un gène majeur, qu'il nomma "RN". Depuis lors, les travaux menés à l'INRA ont permis :

- 1) de confirmer l'existence de ce gène majeur (LE ROY et al., 1990),
- 2) de montrer que l'effet de l'allèle défavorable RN- sur le rendement à la cuisson était bien équivalent à " l'effet Hampshire ",
- 3) de montrer que le génotype RN affecte l'adiposité des animaux, ainsi que de nombreux caractères de qualité de la viande (LE ROY et al., 1995, 1996b, 1999).

Pour identifier RN, la première approche fut de tester l'implication de 6 enzymes clés du métabolisme du glycogène. Cette étude de gènes candidats s'est avérée infructueuse (ESTRADE, 1994). Parallèlement, le développement de nombreux marqueurs génétiques et la production de cartes couvrant le génome du porc permettaient d'envisager la cartographie du gène RN. Des familles informatives ont donc été produites au Domaine INRA du Magneraud en croisant des animaux hétérozygotes RN-/rn+ à des animaux homozygotes pour l'allèle récessif rn+/rn+. Deux cents descendants pour lesquels le génotype RN pouvait être déterminé avec une probabilité d'au moins 90%, ont été identifiés à partir de la mesure du Rendement Technologique Napole (RTN), caractère sur lequel NAVEAU (1986) avait démontré l'existence du gène. L'analyse de marqueurs génétiques sur ces animaux permis de montrer une liaison génétique significative entre le gène RN et un marqueur situé sur le chromosome 15 du porc à une distance de 18 cM de RN (MILAN et al., 1995). Les travaux de cartographie fine en vue de l'identification du gène responsable pouvaient commencer.

1. DE LA LOCALISATION À L'IDENTIFICATION

1.1. Cartographie génétique de la région de RN

Afin de préciser la position du gène RN, nous avons cartographié sur ces mêmes animaux l'ensemble des marqueurs disponibles dans la région identifiée. Nous avons aussi génotypé 450 porcs complémentaires pour lesquels l'estimation du génotype RN était basée sur la mesure du potentiel glycolytique musculaire. Ces travaux nous ont permis de montrer que RN se trouvait dans un intervalle de 7 cM, le marqueur le plus proche, Sw936, étant situé à moins de 2 cM de RN. Ces travaux ont également été publiés indépendamment par les équipes suédoise et allemande (MILAN et al., 1996, MARIANI et al., 1996, LOOFT et al., 1996, revue dans LE ROY et al., 1996a).

1.2. Cartographie cytogénétique fine et cartographie comparée

L'étape suivante consistait à déterminer la position physique de RN sur le chromosome 15. Pour cela, un clone de levure porteuse d'un YAC (chromosome artificiel de levure) contenant le marqueur Sw936 a été isolé à partir de la banque produite à l'INRA de Jouy (ROGEL-GAILLARD et al., 1997). Le YAC ainsi isolé a été cartographié par hybridation in situ sur chromosomes en métaphase sur la bande 15q25. Cette bande correspondant à une région du chromosome 2 humain, nous avons cherché à produire de nouveaux marqueurs à partir des gènes situés sur ce chromosome humain. Nous avons ainsi pu développer un marqueur génétique du gène TNP1, et montrer que ce gène était situé entre les deux marqueurs génétiques flanquants RN. Parallèlement, nous avons cartographié chez le porc ou chez l'homme trois candidats susceptibles d'expliquer les différences observées sur les animaux : UGP2 cartographié grossièrement sur le chromosome 2 humain, PPP1R3 et Glycogénine non cartographiés chez l'homme. La cartographie de ces gènes dans des régions autres que la région de RN, permis d'écarter ces trois candidats.

1.3. Cartographie physique de la région de RN chez le porc

La cartographie génétique de marqueurs nécessite bien évidemment d'identifier un polymorphisme pour le gène à cartographier et de disposer de familles issues de parents doubles hétérozygotes pour le gène RN et le marqueur en question. Pour contourner cette difficulté, nous avons choisi d'utiliser le panel d'hybrides d'irradiation développé à l'INRA (YERLE et al., 1998). Les clones d'un tel panel contiennent chacun le génome complet d'une cellule de hamster, plus une collection de petits fragments d'ADN porcins (les cassures ayant été produites par irradiation des cellules de porc). Plus les gènes sont proches sur un chromosome, plus ils seront présents ou absents ensemble dans les différents clones. Neuf gènes différents situés chez l'homme autour de TNP1 (dont le gène TNP1) ont ainsi été cartographiés sur le panel d'hybrides d'irradiation. Nous avons pu alors montrer qu'autour de RN, l'ordre des gènes était le même chez l'homme et le porc (ROBIC et al., 1999). Les données de la carte humaine, beaucoup plus complètes que celles de la carte porcine, pouvaient donc être utilisées pour générer des marqueurs proches de RN, ou fournir d'éventuels gènes candidats.

1.4. Cartographie physique de la région de RN chez l'homme

Une carte de cette région a alors été développée chez l'homme, afin d'ordonner tous les gènes connus dans la région de RN. Les marqueurs disponibles ont été cartographiés sur le panel d'hybrides d'irradiation à haute définition TNG, présentant une résolution de l'ordre de 50 kb. Nous avons ainsi produit une carte à haute définition comprenant 22 microsatellites, 12 marqueurs anonymes et 79 marqueurs de gènes (identifiés ou putatifs). Ce travail ne nous a pas permis de découvrir de candidat à la position attendue, mais

il a permis de confirmer que l'ordre des gènes est similaire chez le porc et chez l'homme, et de préciser l'environnement génétique du gène RN.

1.5. Clonage de plus de 2 Mb de la région de RN chez le porc

Parallèlement aux travaux de cartographie sur hybrides d'irradiation, nous avons cloné toute la région contenant le gène RN. Par commodité, nous avons utilisé une banque de BAC ("chromosomes artificiels" bactériens) où chaque clone contient en moyenne 135 kb d'ADN porcin cloné (ROGEL-GAILLARD et al., 1999). Pour cela nous avons :

- 1) identifié les BAC contenant des marqueurs proches de RN,
- 2) séquencé les extrémités de ces BAC pour développer de nouveaux marqueurs d'extrémité,
- 3) isolé de nouveaux BAC à partir de ces marqueurs.

Cette démarche itérative a permis de cloner la région de RN dans un contig constitué de plus de 70 BAC et couvrant près de 2 Mb. Sept marqueurs microsatellites ont également été isolés à partir de ces BAC pour densifier la carte génétique.

1.6. Cartographie génétique fine de la région de RN

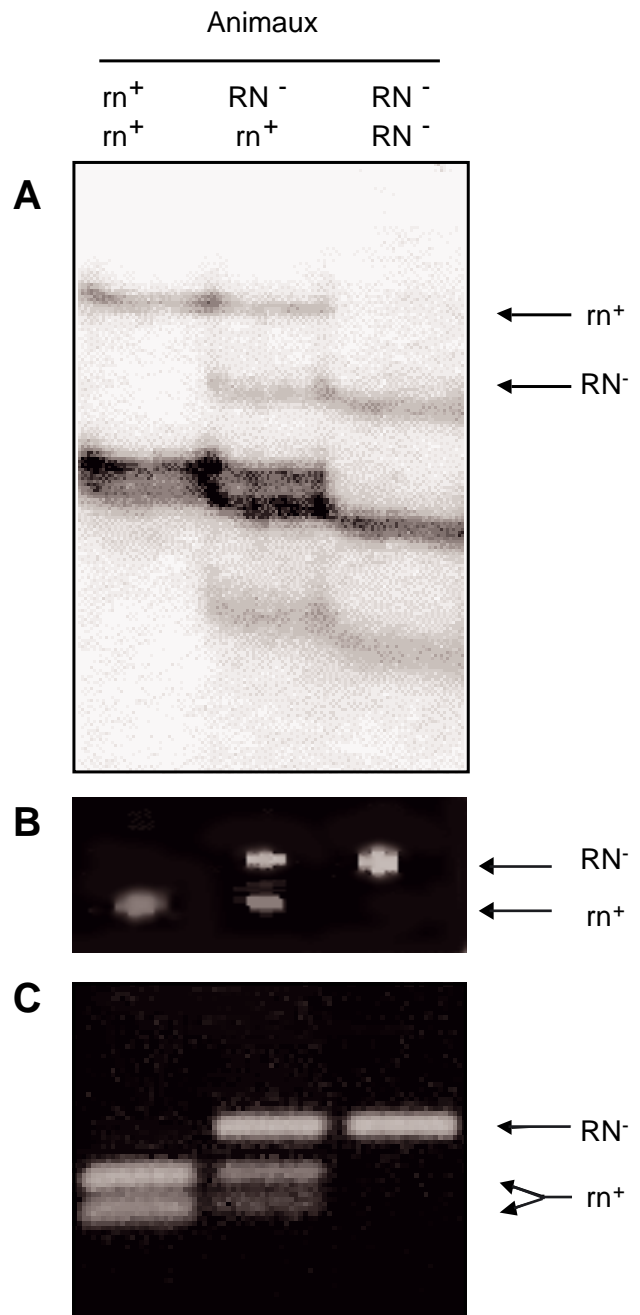
En regroupant les pedigrees français, suédois et allemands, nous disposons de plus de 1000 méioses informatives pour RN. Ces grandes familles nous ont permis de construire une carte génétique très fine des points de recombinaison au voisinage de RN. Vingt-quatre animaux présentant une recombinaison proche de RN ont été étudiés en détail avec plus de 15 marqueurs génétiques situés dans le contig de BAC, et couvrant un intervalle de 2 cM. L'analyse de ces données ne permettant pas de conclure d'une manière non ambiguë, ces marqueurs ont été analysés sur un jeu de 68 verrats Hampshire suédois, de phénotype RN connu. Cette expérience nous a permis de détecter une zone, à l'intérieur du contig de BAC, en très fort déséquilibre de liaison avec RN.

1.7. Identification d'un candidat positionnel

Le BAC contenant les marqueurs en déséquilibre de liaison total a été séquencé au Genome Center de Stockholm. Ce séquençage nous a permis d'identifier la présence d'un gène encore inconnu dans les différentes espèces de mammifères, mais présentant des homologies avec les membres d'une famille de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique de la cellule. Par ailleurs, nous avons montré que ce gène était spécifiquement exprimé dans le muscle, chez l'homme et le porc. Une mutation, susceptible d'expliquer les différences entre RN⁻ et rn⁺, a été trouvée dans la séquence codante. Parmi les animaux analysés jusqu'à présent, cette mutation est totalement et exclusivement rencontrée en association avec RN⁻, elle peut être considérée comme mutation candidate (MILAN et al., 1999). Différentes méthodes ont été développées pour génotyper cette mutation et permettre l'identification des animaux porteurs de la mutation RN⁻ (figure 1).

Figure 1 - Analyse des allèles rn⁺ et RN⁻

- A** : Par technique SSCA (Single Strand Conformation Analysis - analyse de profil de migration d'ADN simple brin sur gel d'acrylamide non dénaturant)
- B** : Par technique LAR (Ligation Reaction - analyse de taille de fragments sur gel d'acrylamide, après ligation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles)
- C** : Par technique PCR-RFLP (polymorphisme au niveau d'un site de reconnaissance d'une enzyme de restriction dans un fragment amplifié par PCR)



2. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Lorsque l'on cherche à identifier le gène responsable d'un effet majeur observé sur les animaux deux approches sont possibles : une démarche d'étude de gènes candidats, où l'on cherche à identifier le gène parmi une liste de gènes candidats physiologiques, et une démarche dite de clonage positionnel, où l'on cherche à cartographier le plus précisé-

ment possible le gène recherché, en "zoomant" sur la région jusqu'à ne plus avoir qu'un (ou quelques) gène(s) dans la région déterminée. L'approche gène candidat peut permettre très rapidement d'identifier le bon gène, mais elle nécessite que le gène soit déjà connu. Au contraire l'approche de "clonage positionnel" est plus longue mais elle permet d'identifier un gène encore inconnu. Dans la pratique on utilise le plus souvent une approche de "candidats positionnels", où l'on recherche des candidats connus à l'issue d'une première étape de cartographie. En effet, à l'issue de la cartographie génétique de RN dans un intervalle de l'ordre de 2 cM avec les marqueurs génétiques disponibles, permettait d'éliminer 99.9 % des gènes. Nous avons facilement pu éliminer trois gènes candidats par leur seul cartographie à l'extérieur de la région de RN.

Selon toute probabilité, le gène RN a donc été identifié par une démarche que l'on peut qualifier de clonage positionnel strict, puisque le gène identifié n'était pas connu jusqu'à présent. C'est à notre connaissance le premier exemple de succès d'une démarche de clonage positionnel strict chez les animaux d'élevage. L'identification du gène va faciliter l'éradication de l'allèle RN⁻ lorsque celle-ci est souhaitée.

La connaissance du gène va également permettre de rechercher d'éventuelles mutations complémentaires dans d'autres populations porcines où l'allèle RN⁻ n'est pas présent. Cette étude visera à identifier d'autres allèles potentiels pouvant également avoir une influence sur le pH ultime de la viande. Parallèlement la connaissance du gène va permettre d'étudier si tous les effets observés sur les caractères de croissance, d'engraissement et de qualité de la viande peuvent être expliqués par le seul gène RN, ou si un polymorphisme a un autre gène, doit également être recherché.

Plusieurs gènes de protéines musculaires étant effectivement trouvés à proximité immédiate, l'implication d'un deuxième gène dans l'effet observé sur les qualités sensorielles de la viande de porc (LE ROY et al., 1996b) ne peut pas être exclu.

Enfin, l'identification du gène RN est également importante puisqu'elle a permis de mettre en évidence un nouveau gène impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique de la cellule musculaire, ainsi qu'un variant de ce gène ayant des effets physiologiques. Il n'est pas exclu que ce gène puisse avoir une importance dans certains diabètes non insulino-dépendants chez l'homme, ou que la connaissance de ce gène ouvre de nouvelles perspectives de traitement de ces maladies. Après l'identification du gène de la sensibilité à l'halothane ayant des effets en partie similaires chez l'homme et le porc, l'identification d'un deuxième gène majeur porcin pourrait également avoir des retombées en santé humaine.

REMERCIEMENTS

Les équipes des trois pays ont travaillé ensemble et en collaboration étroite pour identifier le gène RN. En complément des auteurs de cet article, ont activement participé au travail de clonage positionnel du gène RN les membres suivants des équipes suédoise et allemande : Jin Tae JEON, Kerstin LUNDSTRÖM de l'Université des sciences agricoles d'Uppsala, Norbert REINSCH, Sven PAUL et Ernst KALM de l'Université Christian Albrecht de Kiel. Les auteurs remercient Jean NAVEAU (Pen Ar Lan), ainsi que Pierre CHÉREL (France Hybrides) et Christian LECOURE (SCAPAAG), pour le don d'ADN d'animaux informatifs pour l'étude du gène RN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ESTRADE M., AYOUB S., TALMANT A., MONIN, G., 1994. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, 108, 295-301
- LE ROY P., NAVEAU J., ELSÉN J. M., SELLIER P., 1990. *Genet. Res.*, 55, 33-40.
- LE ROY P., CARITEZ J. C., BILLON Y. et al, 1995. *Journées Rech. Porcines en France*, 27, 165-170.
- LE ROY P., ELSÉN J. M., MILAN D., 1996a. *Journées Rech Porcines en France*, 28, 57-60.
- LE ROY P., JUIN H., CARITEZ J. C. et al, 1996b. *Journées Rech Porcines en France*, 28, 53-56.
- LE ROY P., ELSÉN J. M., CARITEZ J. C. et al, 1999. *Genet. Sel. Evol.*, (Soumis pour publication).
- LOOFT C., REINSCH N., RUDAT I., KALM E., 1996. *Genet. Sel. Evol.*, 28, 437-443
- MARIANI P., LUNDSTRÖM K., GUSTAFSSON U. et al, 1996. *Mamm. Genome*, 7, 52-54.
- MILAN D., LE ROY P., WOLOSZYN N., 1995. *Genet. Sel. Evol.*, 27, 195-199.
- MILAN D., WOLOSZYN N., YERLE M. et al, 1996. *Mamm. Genome*, 7, 47-51.
- MILAN D., JEON J. T., LOOFT C. et al, 1999. (Soumis pour publication).
- MONIN G., SELLIER P., 1985. *Meat Sci.*, 13, 49-63.
- NAVEAU J., 1986. *Journées Rech. Porcines en France*, 18, 265-276.
- ROBIC A., SEROUDE V., JEON J. T. et al, 1999. *Mamm. Genome*, 10, 565-568.
- ROGEL-GAILLARD C., BOURGEOUX N., SAVE J. C. et al, 1997. *Mamm. Genome*, 8, 186-192.
- ROGEL-GAILLARD C., BOURGEOUX N., BILLAULT A., VAIMAN M., CHARDON P., 1999. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 85, 205-211.
- YERLE M., PINTON P., ROBIC A. et al, 1998. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 82, 182-188.