TYPAGES MOLECULAIRES EN SELECTION AVICOLE

Tixier-Boichard Michèle

INRA, Laboratoire de Génétique Factorielle, 78 352 Jouy-en-Josas Cedex

Résumé

Les outils de la biologie moléculaire permettent d'identifier les individus porteurs d'un gène donné quels que soient leur âge, leur état physiologique ou leur sexe. Parmi les gènes majeurs déjà connus chez le poulet, deux exemples sont immédiatement accessibles au sélectionneur avicole : dans le cas du gène de nanisme lié au sexe (*dw*), un typage moléculaire du gène du récepteur à l'hormone de croissance permet d'identifier directement la mutation responsable du nanisme et de détecter facilement les porteurs hétérozygotes apparemment normaux; dans le cas du gène lié au sexe de réduction de la vitesse d'emplumement (*K*), un typage moléculaire permet d'identifier un gène viral endogène (*ev21*) lié de façon très étroite avec le gène *K*, de rechercher des recombinants éventuels et de mieux comprendre la structure de ce locus complexe. Dans les deux cas, le typage a évolué d'une méthode relativement lourde (RFLP) vers un test plus rapide (amplification PCR). Ces tests de dépistage peuvent être une aide précieuse lors de certaines étapes cruciales dans un schéma de sélection. Dans l'avenir, le développement des programmes de cartographie du génome devrait augmenter considérablement le nombre de gènes d'intérêt économique qui seront accessibles par ces méthodes.

Abstract

Molecular typing in poultry breeding

Molecular biology offers a wide range of tools in order to identify the carriers of a given gene, whatever the age, physiological conditions or sex of the animals studied. Among major genes already known in the chicken, two examples are immediately available to the poultry breeder. In the case of sex-linked dwarfism (*dw*), molecular typing of the growth hormone receptor gene directly shows the mutation responsible for the dwarfism and provides an easy identification of heterozygous carriers which are phenotypically normal. In the case of sex-linked late-feathering mutation (*K*), molecular studies have shown a linkage with the endogenous viral gene *ev21*; molecular typing can be used to search for recombinants and to improve the knowledge of this complex *ev21-K* locus. In each case, techniques have evolved from a relatively heavy methodology (RFLP) towards a faster methodology (PCR). Such diagnostic tests can be very helpful at some critical stages of breeding programs. In the future, genome mapping programs are expected to increase dramatically the number of genes of economical importance that will be identified at the molecular level.

Introduction

Le développement des techniques de la biologie moléculaire a permis, entre autres, de révéler directement la variabilité de l'ADN du génome des animaux domestiques. De nombreux travaux visent à mettre en relation cette variabilité avec des caractéristiques morphologiques ou fonctionnelles des animaux. Dans certains cas on commence par s'intéresser à un gène particulier dont on connaît la fonction, on parle alors de gène "candidat"; ou bien, il n'existe aucune information a priori et on identifie des gènes anonymes, voisins du gène inconnu recherché, ce sont des gènes "marqueurs". L'obtention d'un grand nombre de marqueurs, leur localisation les uns par rapport aux autres ainsi que sur les chromosomes font partie des programmes de cartographie du génome qui ne seront pas discutés ici. Il existe déjà chez le poulet un nombre non négligeable de gènes connus parce qu'ils ont un effet quantitatif important sur un caractère économique ou bien parce qu'ils ont un effet qualitatif exploité pour la production. Deux exemples ont été choisis ici pour illustrer l'utilisation des outils de la biologie moléculaire avec les deux approches de gène candidat ou de gène marqueur.

Mise en évidence d'un polymorphisme au niveau moléculaire

Le premier niveau d'étude est généralement une recherche d'un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). L'ADN génomique est digéré par une enzyme qui reconnaît une séquence spécifique et

connue de 4, 6 ou 8 bases, les fragments sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille et une hybridation moléculaire avec une sonde permet de visualiser les fragments qui ressemblent plus ou moins complètement à cette sonde. La sonde est le plus souvent un fragment d'ADN qui est obtenu par clonage d'un gène connu. Des fragments de différente taille sont révélés selon la position des sites de coupure de l'enzyme dans l'ADN génomique. La variabilité des sites de coupure peut être due à l'existence de mutations ponctuelles ou de modifications structurales plus importantes, délétion ou insertion de séquences nucléotidiques plus ou moins grandes. Les polymorphismes RFLP sont généralement codominants et permettent d'identifier les génotypes hétérozygotes ou homozygotes au locus reconnu par la sonde. L'ensemble des étapes à mettre en oeuvre rend cette méthode assez longue; elle a cependant permis d'étudier de nombreux gènes et d'établir la première carte génétique moléculaire du poulet (Bumstead et Palyga, 1992).

Une autre approche du polymorphisme de l'ADN est devenue possible avec l'invention du procédé d'amplification en chaîne de l'ADN ou PCR. Ce procédé n'utilise pas une sonde comme le RFLP mais exige la connaissance même partielle de la séquence nucléotidique du gène étudié. A partir de cette séquence, on synthétise des petits fragments d'ADN (amorces en simple brin) qui vont s'apparier, dans certaines conditions de température, avec leur séquence complémentaire dans l'ADN génomique; puis une enzyme particulière (*Taq* polymérase) va synthétiser le brin d'ADN complémentaire à la séquence génomique qui se trouve entre deux amorces. La taille et le nombre de fragments amplifiés sont facilement révélés par électrophorèse. Une modification de taille indique une délétion ou une insertion, l'absence d'un fragment peut suggérer une mutation au niveau de la séquence d'appariement de l'amorce. La présence d'un nombre variable de très courtes séquences répétées au sein du fragment amplifié est à l'origine du polymorphisme de type microsatellite très utilisé dans les programmes de cartographie du génome. L'existence d'une mutation ponctuelle au sein du fragment amplifié peut être révélée par hybridation du produit de l'amplification avec un oligonucléotide portant la mutation (A) ou un oligonucléotide de séquence normale (B), on obtient un seul signal positif avec A pour un génotype homozygote muté, un seul signal positif avec B pour un homozygote normal et la présence des deux signaux pour un hétérozygote (méthode PCR-ASO). La réaction PCR est rapide et peut se faire à partir d'une préparation simplifiée d'ADN génomique. Plusieurs variantes peuvent encore être proposées (Rafalski et Tingey, 1993).

Les modifications de l'ADN ainsi mises en évidence ne sont pas forcément associées à une différence fonctionnelle du gène étudié. Il faut alors procéder à une étude de l'ARN messager correspondant au gène étudié.

Mutations d'un gène candidat : le cas du gène de nanisme lié au sexe

La mutation récessive liée au sexe *dw* est connue depuis plus de 40 ans et se trouve à l'origine de la création de la lignée commerciale Vedette, mère nanifiée du poulet de chair. Son mode d'action est resté longtemps inconnu mais une accumulation d'informations physiologiques pouvait suggérer un défaut du récepteur à l'hormone de croissance (Tixier-Boichard et al., 1989). Cette hypothèse a pu être vérifiée grâce au clonage de la séquence d'ADN codant pour le récepteur à l'hormone de croissance (rGH) chez le poulet (Burnside et al., 1991). L'utilisation de la sonde rGH en RFLP a permis d'identifier trois défauts moléculaires différents chez des poulets nains d'origine génétique indépendante (Tableau 1).

TABLEAU 1- Différents types d'anomalies moléculaires du gène rGH chez les poulets nains (*dw*)

Origine	RFLP	ARN	Nature et localisation de l'anomalie		Typage possible
(1) poulet de chair commercial, (Agarwal et al., 1994)	oui	modifié	délétion	domaine intra-cellulaire du récepteur	RFLP ou PCR
(2) Leghorn, (Duriez et al., 1993)	non	normal	mutation ponctuelle	domaine extra-cellulaire	PCR-ASO
(3) poulet de chair, (Huang et al., 1993)	non	modifié	mutation ponctuelle	domaine extra-cellulaire	PCR-ASO (non testé)

Les modifications de l'ARN messager des mutations (1) et (3) permettent de comprendre le déficit fonctionnel créé par les anomalies de l'ADN. La mutation ponctuelle décrite en Leghorn (2) modifie un seul acide aminé à une position critique dans la protéine et suffit à rendre le récepteur non fonctionnel. Une des premières applications possibles de ces travaux est de pouvoir distinguer directement les mâles hétérozygotes des homozygotes normaux lors de l'introduction du gène *dw* dans une nouvelle lignée, sans faire de contrôle sur descendance ni d'études de performances. Pour cela le test de typage doit être simple et la procédé PCR est toujours préférable. Devant le polymorphisme moléculaire trouvé chez les nains, on peut aussi penser à rechercher d'autres variants du gène rGH chez les animaux normaux avec une approche RFLP.

Liaison d'un gène viral endogène avec la mutation *K*

La mutation dominante liée au sexe notée *K* est utilisée depuis de nombreuses années pour l'autosexage de certaines souches commerciales. Son mode d'action sur la croissance du follicule plumeux est inconnu. Une liaison génétique entre la mutation *K* et un gène viral, noté *ev21*, a été mise en évidence chez les poules Leghorn par un procédé RFLP à l'aide d'une sonde virale (Bacon et al., 1988). Le gène *ev21* constitue donc un marqueur moléculaire pour le gène *K*, lui-même inconnu. Ce résultat peut avoir plusieurs applications:

- * établir si la liaison *K-ev21* existe dans toutes les souches;
- * rechercher des recombinants ayant gardé la mutation *K* sans le gène *ev21*;
- * utiliser le gène *ev21* comme un point de départ pour identifier le gène contrôlant la vitesse d'emplumement.

Un progrès décisif a été accompli avec le clonage d'une sonde spécifique du site d'insertion du gène *ev21* dans le génome du poulet (Levin et Smith, 1990). L'utilisation de cette sonde en RFLP a permis de confirmer la présence de l'*ev21* dans les différentes souches possédant la mutation *K* (Smith et Levin, 1991). Une description plus complète a été obtenue avec le séquençage de la région d'insertion (Levin et Smith, 1991). Cependant, cette région a révélé une complexité inattendue : elle est dupliquée, si bien qu'il existe conjointement un site d'insertion (noté OS) occupé par le virus *ev21* et une région "jumelle" adjacente (notée US) dépourvue de l'*ev21*. Une des applications de cette étude moléculaire est de rechercher des animaux *K* dépourvus du gène *ev21*, dans le but de réaliser l'autosexage avec un allèle d'emplumement lent sans effets secondaires. La rareté apparente du génotype US-*K* exige l'étude d'un grand nombre d'individus, notamment dans les souches commerciales. Un test diagnostique rapide et peu coûteux reposant sur un procédé PCR a été mis au point dans ce but (Tixier-Boichard et al., 1994). Si le variant US-*K* est vraiment très rare, sa fréquence ne pourra être augmentée que très lentement si on ne veut pas augmenter aussi la consanguinité. La conduite à tenir dépendra des effectifs de la lignée, du coût du sexage et du coût lié à l'utilisation du génotype défavorable *ev21-K*.

L'étape ultime de ces études serait l'identification du gène contrôlant la vitesse d'emplumement et dont le fonctionnement apparaît perturbé par la proximité du gène viral *ev21*, il s'agit d'un travail bien plus lourd que la recherche de polymorphismes.

Perspectives

Les deux exemples choisis correspondent à des situations génétiques simples a priori, où un seul gène est impliqué. A chaque fois, l'approche moléculaire a montré une variabilité inattendue et a soulevé de nouvelles questions. La situation du gène candidat associé à une mutation classique est évidemment la plus complète, obtenue à l'issue d'une longue accumulation de données génétiques et physiologiques. En l'absence d'un mécanisme d'action supposé, il sera particulièrement important d'utiliser au maximum toute information préliminaire sur les effets associés à un gène pour orienter la stratégie d'identification. L'exemple du gène *K* comme de nombreux autres exemples chez l'Homme et les mammifères montrent qu'il y a encore un long chemin entre l'identification d'un marqueur lié et la connaissance du gène proprement dit. Cependant l'information apportée par le marqueur peut déjà être directement utilisée pour éliminer des génotypes indésirables lors des étapes de tri inhérentes à tout programme de sélection.

Références

- Agarwal S.K., Coburn L.A., Burnside J., 1994. *J. Endocrinol.*, 142, 427-434.
Bacon L.D., Smith E.J., Crittenden L.B., Havenstein G.B., 1988. *Poult. Sci.*, 67, 191-197.
Bumstead N., Palyga J., 1992. *Genomics*, 13, 690-697.
Burnside J., Liou S.S., Coburn L.A., 1992. *Endocrinol.*, 128, 3183-3192.
Duriez B., Sobrier M-L., Duquesnoy P., Tixier-Boichard M., Decuypere E., Coquerelle G., Zeman M., Goossens M., Amselem S., 1993. *Mol. Endocrinol.*, 7, 806-814.
Huang N., Coburn L.A., Agarwal S.K., Marks H., Burnside J., 1993. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1391-1398.
Levin I., Smith E.J., 1990. *Poult. Sci.*, 69, 2017-2026.
Levin I., Smith E.J., 1991. *Poult. Sci.*, 70, 1948-1956.
Rafalski J.A., Tingey S.V., *Trends Genet.*, 9, 275-279
Smith E.J., Levin I., 1991. *Poult. Sci.*, 70, 1957-1964.
Tixier-Boichard M., Huybrechts L.M., Kuhn E., Decuypere E., Charrier J., Mongin P., 1989. *Genet. Sel. Evol.*, 21, 217-234
Tixier-Boichard M.H., Benkel B.F., Chambers J.R., Gavora J.S., 1994. *Poult. Sci.*, 73, 1612-1616.