

AGENAE



Analyse du **GEN**ome des **A**nimaux d'**E**levage

Séminaire AGENAE 2007
8-9 février 2007 à la Maison de la Chimie
(Paris)

Sommaire

Le programme AGENAE/GENANIMAL 2002-2006 – Un premier bilan	3
Analyse de la réponse de la glande mammaire à l'infection dans un modèle de sélection divergente.....	5
De nouveaux marqueurs de la qualité de la viande bovine	7
Sélection assistée par marqueurs chez les bovins laitiers.....	9
Vers une identification des gènes de résistance aux maladies chez la truite arc-en-ciel.....	11
Bilan des programmes reproduction	12
Perspectives – Génomique, biologie intégrative, diversité génétique : quelles attentes pour l'élevage de demain ?	13
Liste des participants.....	15

LE PROGRAMME AGENAE / GENANIMAL 2002-2006

UN PREMIER BILAN

C Chevalet, pour le directoire du GIS AGENAE

UMR 0444 INRA/ENVT Génétique cellulaire, 31326 Castanet Tolosan, France

L'élevage français, s'il est bien positionné au niveau international, fait face à une compétition intense, il doit être très réactif aux attentes changeantes de la part des consommateurs, aux exigences réglementaires, et aux attentes de la société en matière de qualité et de sécurité alimentaire, de respect de l'environnement et de bien-être animal. Les avancées scientifiques dans les domaines de la génomique, de la protéomique, de la métabolomique et plus généralement des biotechnologies ouvrent des perspectives nouvelles pour accroître la maîtrise des grandes fonctions physiologiques, de la santé et du bien-être chez les animaux.

A la fin des années 90, ces constatations ont conduit les équipes de recherche de l'INRA et les structures professionnelles de l'élevage à concevoir un renforcement de leur partenariat pour relever ces défis, à un moment où la défection des soutiens européens à la recherche animale pouvait mettre en cause les positions leaders que les équipes françaises avaient acquises en génomique animale.

Le projet AGENAE s'est constitué autour d'une triple ambition et d'un principe de partenariat renforcé. Trois ambitions : maintenir le leadership en génomique en concentrant l'effort sur 4 espèces de référence (bovin, truie, porc, poule) ; promouvoir l'interdisciplinarité et la biologie intégrative ; valoriser rapidement les savoir-faire et les nouvelles technologies au bénéfice de l'élevage. Un partenariat renforcé pour : partager les décisions stratégiques ; partager les investissements ; partager la propriété industrielle générée par les travaux conduits en commun.

La conduite du programme AGENAE s'appuie sur un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) signé pour cinq ans en mai 2002. Les membres du GIS AGENAE sont d'une part deux organismes de recherche publique (l'INRA et le CIRAD) et d'autre part des associations professionnelles représentant les principales filières animales (APIS GENE pour la filière des bovins et petits ruminants, CIPA pour la filière aquacole, BIOPORC pour la filière porcine, AGENAVI pour la filière avicole).

Le programme s'est développé principalement grâce à trois initiatives convergentes : la mobilisation de ressources propres de l'INRA pour le développement de la génomique ; le soutien financier aux projets retenus à la suite des appels à projets annuels GENANIMAL émis depuis 2003 par le Ministère de la Recherche puis à partir de 2005 par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) ; enfin les aides apportées aux projets à vocation finalisée par les structures professionnelles membres du GIS AGENAE. La filière piscicole (CIPA) a de plus mobilisé des moyens européens importants (IFOP : instrument financier d'orientation de la pêche) pour soutenir ses projets et participer aux investissements généraux. Globalement, près de 23 millions d'euros (hors salaires publics) ont été apportés : sur les ressources propres de l'INRA (19 %), par le Ministère de la Recherche (20 %), par l'ANR (30 %), et par les partenaires professionnels (31 % en incluant les aides de l'IFOP).

Les travaux réalisés et en cours peuvent être classés en 3 catégories : investissements scientifiques et méthodologiques ; recherche cognitive sur le fonctionnement des génomes ; actions finalisées pour l'élevage.

Investissements : mobilisant 33% des moyens réunis (soit 7,58 M€, sans compter les contributions des centres nationaux de génomique ni les apports gracieux de l'USDA) et l'essentiel des ressources de l'INRA consacrées au programme, ils ont permis de participer activement aux consortiums internationaux pour le séquençage complet des génomes animaux par des contributions significatives en cartographie, et de produire et distribuer des ressources (« puces » à ADN, logiciels informatiques)

Séminaire AGENAE 2007

pour l'ensemble des projets. Le positionnement international s'est notamment appuyé sur un renforcement des échanges avec les équipes homologues de l'USDA. Les investissements les plus significatifs sont la création du centre national de ressources génomiques animales (GADIE : <http://www-crb.jouy.inra.fr>) à Jouy en Josas, une structure à vocation nationale et internationale, et celle de la plate-forme bioinformatique SIGENAE (<http://www.sigenae.org>).

Recherches cognitives : bénéficiant de 22 % des aides (4,96 M€, exclusivement publiques) au programme elles concernent en particulier l'étude des mécanismes génétiques des réponses aux infections, des développements méthodologiques ou biotechnologiques, et des recherches fondamentales sur la comparaison des génomes ou la recherche de traces de la domestication.

Actions finalisées : sur la période 2002-2008, une trentaine de projets auront bénéficié de 45 % du budget du programme (10,31 millions d'euros, dont 58 % d'apports professionnels) et auront mobilisé environ 340 années de chercheurs plein temps. La répartition de ces projets finalisés retenus au cours des cinq premières années de fonctionnement du programme AGENAE / GENANIMAL est résumée dans le tableau ci-dessous

espèce ou groupe d'espèces	bovins et petits ruminants	porc	poule et autres espèces avicoles	truite et autres espèces aquacoles
reproduction : fertilité des gamètes, déterminisme du sexe, développement de l'embryon	7			3
production de viande : croissance, composition corporelle, qualités du produit	3	1	2	1
immunité, santé animale, sécurité alimentaire	1		1	2
lactation, composition du lait	2			
nutrition				3
anomalies génétiques	1			
biotechnologie, méthodes	2			1

Ce bilan des projets AGENAE / GENANIMAL mis en œuvre depuis 2002 met en évidence une grande diversité thématique des projets soutenus dans le cadre de ce programme de génomique des animaux d'élevage. Par rapport à ses ambitions, le projet a permis de maintenir la place des équipes françaises de génomique dans la compétition internationale, et notamment de bien nous placer dans le consortium salmonidés, la truite demeurant la seule de nos espèces de référence dont le génome n'est pas encore complètement séquencé. Pour l'essor de la biologie intégrative, les outils technologiques longtemps attendus sont maintenant réunis, quelques projets fondamentaux comme la recherche de « eQTL » chez le poulet, mais aussi les projets finalisés sur la nutrition chez le poisson, sur le lait et la reproduction chez les ruminants sont à la fois très originaux au niveau international, et très prometteurs compte tenu de l'originalité des matériels animaux disponibles. Parmi les projets finalisés, l'identification de nouveaux marqueurs biologiques de qualité (viande, gamète), le repérage de nouveaux QTL de fertilité, l'identification de gènes importants (anomalie, conformation), le prochain renouvellement des marqueurs génétiques pour la sélection, illustrent les premières retombées concrètes. La constitution de bases de données et de collections d'échantillons très importantes et uniques au monde est aussi à retenir comme résultat très positif et porteur de nouveaux projets.

**ANALYSE DE LA REPOSE DE LA GLANDE MAMMAIRE A L'INFECTION DANS UN
MODELE DE SELECTION DIVERGENTE**

Laboratoires participants (responsables scientifiques): IASP, INRA, 37380 Nouzilly (P. Rainard, C. Riollet); SAGA, INRA, 31326 Castanet-Tolosan (R. Rupp); GPL, INRA, 78350 Jouy-en-Josas (P. Martin); IHAP, UMR 1225 INRA/ENVT, 31076 Toulouse (D. Bergonier, G. Foucras)

Projet finalisé soutenu par APIS-GENE, le FRT, l'ANR et l'INRA.

Au cours des dernières décennies, les ruminants laitiers ont été sélectionnés sur la production (quantité de lait, taux butyreux et protéique), et des progrès substantiels ont été accomplis. Les pratiques zootechniques ont évolué pour satisfaire des besoins physiologiques toujours croissants et accompagner cette haute production. Concernant la santé de la mamelle, des mesures de prophylaxie sanitaire ont été mises en œuvre à grande échelle, et sont maintenant, en élevage bovin tout au moins, largement utilisées. En dépit des efforts réalisés, la fréquence des infections mammaires n'a pas diminué autant qu'on aurait pu l'espérer. Une augmentation de la fréquence des mammites cliniques est même notée dans les élevages.

On sait maintenant qu'il existe une corrélation génétique négative entre certains critères de production et la fréquence des mammites cliniques. On a donc sélectionné des animaux laitiers plus performants, mais plus sensibles aux infections mammaires. Pour corriger cette dérive, un paramètre lié aux mammites a été incorporé dans l'index de sélection des taureaux (1997) et plus récemment des béliers reproducteurs (2001). Ce paramètre, c'est la concentration en cellules somatiques (CCS). Cet indicateur de la santé de la mamelle présente un énorme avantage : il est disponible, au travers du contrôle laitier, sur des effectifs considérables. La sélection contre les mammites repose, dans la plupart des pays d'Europe et aux USA, sur ce critère, seul ou associé à la fréquence des mammites cliniques. Mais ce critère est un critère synthétique. D'une part il témoigne à la fois de la fréquence des infections mammaires et de leur sévérité (plus précisément de l'intensité de la réaction inflammatoire). D'autre part, il change de nature en fonction de sa valeur : pour les hautes valeurs de CCS, qui correspondent aux mammites, les cellules qui le composent sont des polynucléaires neutrophiles, alors que pour les basses valeurs, qui correspondent à des glandes saines, ce sont des macrophages et des lymphocytes. Comme il est couramment admis que les macrophages du lait sont responsables du déclenchement de la réaction inflammatoire de la glande mammaire suite à une intrusion bactérienne, certains auteurs ont émis l'hypothèse que la réduction des CCS à des valeurs très faibles pourrait entraîner une baisse de la réactivité de la mamelle aux infections.

Le projet a pour objectifs principaux :

- L'évaluation des effets de la sélection « CCS » sur la réaction inflammatoire de la mamelle et la résistance aux infections mammaires.
- L'identification de certains des mécanismes de défense concernés et modifiés par la sélection, avec des approches immunologique, transcriptomique et protéomique.
- L'appréciation de la capacité des cellules épithéliales mammaires à déclencher la réaction inflammatoire indépendamment des macrophages.

La conduite du projet repose sur la comparaison de la résistance aux mammites de deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur la base des CCS. Le principe du protocole pour obtenir les 2 groupes de brebis est celui d'une sélection divergente sur 1 génération à partir de béliers de race Lacaune d'index génétiques CCS extrêmes et des mères extrêmes disponibles dans l'Unité Expérimentale de La Fage (bassin laitier de Roquefort).

Une première cohorte de brebis divergentes CCS+ et CCS- (environ 40 animaux/lignée) est entrée en lactation début 2005. Dans les conditions naturelles d'exposition aux mammites dans le domaine de La Fage, la fréquence d'infections mammaires (mammites subcliniques) a été trois fois supérieure dans le groupe CCS+, qui a présenté en moyenne des CCS deux fois plus élevées que le groupe CCS- (850 000 cellules/ml vs 405 000 cellules/ml). La fréquence d'abcès intra-mammaires a été nettement plus élevée dans le groupe CCS+ (17,1% des mamelles) que dans le groupe CCS- (0,1%).

Les infections expérimentales réalisées à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse avec *Staphylococcus aureus* (pathogène responsable de mammites cliniques) et *Staphylococcus epidermidis* (responsable de mammites chroniques moins sévères) a mis en évidence une sensibilité supérieure des brebis CCS+ par rapport aux CCS-, avec des scores cliniques plus élevés et une excrétion de bactéries dans le lait supérieure chez les brebis CCS+. L'analyse chromatographique, couplée à la spectrométrie de masse (INRA GPL), des laits collectés pendant l'infection a révélé une protéolyse de la fraction caséique et une exsudation plasmatique plus importantes dans le groupe CCS+. Ces résultats indiquent que les brebis CCS+ ont moins bien contrôlé l'infection et ont développé une réaction inflammatoire plus sévère que les brebis CCS-. Par ailleurs, l'analyse des laits de mammite a permis d'identifier des marqueurs précoces potentiels d'inflammation, qui pourraient servir d'indicateurs de la qualité hygiénique et technologique du lait.

La capacité des cellules épithéliales mammaires (CEM) à donner l'alerte et à déclencher la réaction inflammatoire a été étudiée in vitro avec un système de co-culture de CEM primaires avec des *S. aureus* ou *Escherichia coli*. Les mesures ont indiqué la transcription (ARNm) et la production (protéines) de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines capables d'attirer les polynucléaires neutrophiles. L'ensemble des résultats indique que les CEM pourraient déclencher la réaction inflammatoire indépendamment des macrophages.

Un volet important du projet prévoyait l'utilisation de puces à ADNc pour comparer les profils transcriptionnels de différents types cellulaires, comme les cellules du lait isolées pendant les infections expérimentales, ou des CEM bovines ou ovines stimulées in vitro. Des problèmes de disponibilité des puces ADN ont retardé ces analyses. Cependant, le matériel biologique est stocké et sera disponible pour les analyses qui vont commencer prochainement.

En conclusion, l'objectif de création de deux groupes de brebis fortement divergents en terme de CCS a été atteint. Cet outil biologique a permis de vérifier que la sélection sur le critère CCS permet bien de sélectionner des animaux moins sensibles aux infections mammaires dans des conditions naturelles d'exposition ou des conditions expérimentales contrôlées. Les analyses réalisées sur les prélèvements biologiques, qui sont en cours de réalisation ou d'analyse, permettent déjà d'affirmer que les deux lignées diffèrent non seulement par la fréquence des mammites, mais aussi par l'intensité et la nature des réactions inflammatoires induites. Des marqueurs potentiels d'inflammation ont été identifiés. Enfin, les études in vitro suggèrent que les cellules épithéliales mammaires sont capables d'initier la réaction inflammatoire, ce qui laisse penser que les macrophages pourraient ne pas être indispensables et donc que les animaux à faible CCS conservent leur réactivité aux infections mammaires.

DE NOUVEAUX MARQUEURS DE LA QUALITE DE LA VIANDE BOVINE

J.-F. Hocquette

INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores, Domaine de Theix, 63122 St-Genès-Champanelle

Pour regagner des parts de marché, les éleveurs de races à viande sont particulièrement attentifs à l'adéquation entre la qualité de la viande et l'attente du consommateur. Les qualités sensorielles de la viande bovine (tendreté, jutosité et flaveur) présentent une grande variabilité qui s'explique en partie et selon nos connaissances actuelles par les caractéristiques des fibres, du tissu conjonctif et du gras intramusculaires. Toutefois, ces caractères ne permettent d'expliquer au plus seulement qu'un quart à un tiers de la variabilité des qualités sensorielles de la viande. Afin de maîtriser ces qualités, il est donc nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension de leur déterminisme, notamment en analysant dans le muscle les gènes qui leur sont associés. Il s'agit de l'enjeu des programmes MUGENE et QUALVIGENE, dont l'objectif est d'identifier des marqueurs biologiques des qualités sensorielles de la viande bovine au moyen de la génomique. Ces programmes font suite à des travaux antérieurs ayant porté sur le développement des outils de génomique¹, sur le suivi de l'expression des gènes et des protéines dans le muscle au cours du développement² et en fonction du potentiel de croissance musculaire³.

La disponibilité de marqueurs moléculaires reliés à la qualité des viandes représente un atout majeur pour la filière. En effet, ces marqueurs pourraient être intégrés par les organismes de sélection pour améliorer le troupeau allaitant non seulement pour des caractères de production, mais aussi de qualité de viande. L'objet du projet QUALVIGENE est de constituer un puissant outil d'analyse du déterminisme génétique des qualités de la viande indispensable au développement de méthodes de sélection basées sur des informations moléculaires. La constitution de cet outil repose sur les programmes de testage sur descendance des taureaux d'insémination artificielle dans les trois races à viande spécialisées : Charolaise, Limousine et Blonde d'Aquitaine.

Le projet MUGENE s'appuie sur les relations qui pourront être mises en évidence entre l'expression des gènes et des protéines musculaires d'une part et des phénotypes divergents d'animaux qui diffèrent par leur potentiel de croissance musculaire, leur mode de conduite, la vitesse de maturation ou la tendreté finale de leur viande d'autre part. Les premières études du transcriptome et du protéome confirment la pertinence de cette approche de biologie intégrative en complément des approches biochimiques conduites jusqu'à présent.

Approches expérimentales:

QUALVIGENE: En plus des aptitudes bouchères, la composition de la carcasse, les caractéristiques musculaires et les qualités de la viande sont enregistrées pour plus de 3200 taurillons issus de 114 pères. Les qualités de la viande sont mesurées par des jurys entraînés et sont complétées par des mesures physiques (force de cisaillement) ou biochimiques des caractéristiques du muscle. Tous ces résultats sont enregistrés dans une base de données qui servira également à développer un modèle de prédiction de la qualité de la viande bovine dans le cadre du programme européen ProSafeBeef (2007-2011). De plus, ce projet comporte la constitution d'une banque d'ADN de tous les taurillons, de leur père et de leur mère pour rechercher des marqueurs polymorphes (SNP et microsatellites) dans des gènes candidats rapportés dans la littérature ou issus des programmes GEMQUAL (programme

¹ (i) Sudre K., Leroux C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., Martin P. 2005. A collection of bovine cDNA probes for gene expression profiling in muscle. *Mo. Cell. Probes*, 19, 61-70 ; (ii) Meunier B., Bouley J., Piec I., Bernard C., Picard B., Hocquette J.F., 2005. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 340, 226-230.

² Sudre K., Leroux C., Piétu G., Cassar-Malek I., Petit E., Listrat A., Auffray C., Picard B., Martin P., Hocquette J.F. 2003. Transcriptome analysis of two bovine muscles during ontogenesis. *J. Biochem.*, 133, 745-756. ;

³ (i) Bouley J., Meunier B., Chambon C., De Smet S., Hocquette J.F., Picard B., 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 5, 490-500 ; (ii) Sudre K., Cassar-Malek I., Listrat A., Ueda Y., Leroux C., Jurie C., Auffray C., Renand G., Martin P., Hocquette J.F. 2005. Biochemical and Transcriptomic analyses of two bovine skeletal muscles in Charolais bulls divergently selected for muscle growth. *Meat Sci.*, 70, 267-277.

européen achevé) ou MUGENE. Cet outil permettra également, grâce à une approche protéomique, de caractériser les profils protéiques des viandes tendres en opposition aux viandes dures.

MUGENE: En plus des caractéristiques des animaux et du muscle citées pour le précédent programme, les objectifs du projet MUGENE sont de (i) déterminer le profil d'expression des gènes et des protéines musculaires associé à la production d'une viande de bonne qualité en fonction du potentiel de croissance musculaire et des facteurs d'élevage, et (ii) de découvrir de nouveaux marqueurs moléculaires ou des gènes polymorphes qui contrôlent la qualité de la viande. L'intérêt de ces gènes sera ultérieurement évalué dans le projet QUALVIGENE.

Résultats:

Alors qu'il est bien connu que le développement musculaire important des animaux culards a pour origine la présence de deux copies mutées du gène de la myostatine, l'effet d'une seule copie mutée chez les animaux hétérozygotes d'apparence normale n'avait pas encore été évalué. Le programme QUALVIGENE a permis d'estimer l'effet de la présence d'une copie de la mutation du gène myostatine sur les performances de 408 jeunes bovins issus de 22 taureaux Charolais. Les effets observés sont très significatifs pour les qualités des carcasses (meilleur rendement à l'abattage, meilleure conformation et moins de gras), sur les caractéristiques musculaires et la couleur (moindres teneurs en lipides intramusculaires et en collagène, fibres musculaires plus fines et viande plus claire). Malgré ces effets significatifs, il n'y a pas d'effet sur les qualités de la viande si ce n'est une tendance à donner une viande plus tendre⁴. Ce travail montre que les jeunes bovins de boucherie Charolais porteurs d'une copie mutée du gène de la myostatine ont des performances supérieures aux non porteurs alors que rien ne les distingue en vif. Ceci illustre tout l'enjeu de l'utilisation des tests génétiques pour détecter les animaux ayant un potentiel génétique supérieur pour les qualités des carcasses ou de la viande. A côté de ce travail, le dispositif QUALVIGENE a aussi permis de montrer que la présence d'une nouvelle isoforme de myosine dans le muscle est associée à des viandes plus tendres et plus juteuses.

Dans le cadre de MUGENE⁵, les résultats d'analyse biochimique du muscle ont permis de montrer que la sélection génétique en faveur du potentiel de croissance musculaire tend à rendre les muscles plus blancs, plus glycolytiques et plus rapides en terme de vitesse de contraction. Des travaux récents d'analyse du transcriptome ont mis en évidence 58 gènes dont le profil d'expression est associé à la fois à la tendreté, la jutosité et la saveur suggérant qu'il est possible d'améliorer simultanément ces trois critères de qualité. Le résultat majeur est la mise en évidence d'une relation négative entre l'expression du gène DNAJA1 et la tendreté évaluée par un jury de dégustation. Le niveau d'expression de ce gène explique jusqu'à 50-63% de la variabilité de la tendreté. Si les mécanismes mis en jeu restent à élucider, l'expression de ce gène constitue donc un bon candidat pour être un marqueur négatif de tendreté. Ce résultat a donné lieu à un dépôt de brevet⁶. De plus, nous avons mis en évidence une régulation différentielle des gènes du métabolisme énergétique musculaire chez les taurillons à fort potentiel de croissance (sur-expression de 2/3 des gènes de la glycolyse, sous-expression de 50% des gènes du cycle de Krebs).

En conclusion, les travaux de génomique sur la qualité de la viande bovine dans le cadre d'AGENAE/GENANIMAL (FRT, ANR) ont permis à l'INRA (Jouy-en-Josas, Theix, Limoges) et ses partenaires (APIS-GENE) d'obtenir des résultats originaux et prometteurs, et ainsi d'être reconnus sur le plan international. Les investissements réalisés à ce jour nécessitent d'être pleinement valorisés et les premiers résultats obtenus pour des taurillons charolais (brevet par exemple) doivent être confirmés pour d'autres races bovines et d'autres types de bovins (femelles, bœufs).

⁴ Renand G., Levéziel H., Payet N., Hocquette J.F., Lepetit J., Denoyelle C., Dodelin V., Malafosse A. Journées des Sciences du Muscle et de la viande, Clermont-Ferrand 2006, 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Brasil

⁵ Hocquette J.F., Morzel M., Levéziel H., Renand G. et coll. . Journées des Sciences du Muscle et de la viande, Clermont-Ferrand 2006

⁶ Genomic marker for meat tenderness. Patent EP06300943.5 (September, 12th, 2006). J Agric Food Chem. En revision.

SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS CHEZ LES BOVINS LAITIERS

**D. Boichard, S. Fritz², F. Guillaume, J.J. Colleau, M.N. Rossignol³,
M.Y. Boscher³, M. Gautier¹, A. Eggen¹, T.Druet**

INRA, UR337 Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78350 Jouy en Josas, France

¹INRA, UR339 Laboratoire de Génétique Biochimique et Cytogénétique, 78350 Jouy en Josas, France

²UNCEIA, 149 Rue de Bercy, 75 595 Paris Cedex 12, France

³LABOGENA, 78352 Jouy en Josas, France

On appelle Sélection assistée par marqueurs (SAM) toute procédure de sélection utilisant une information de polymorphisme de l'ADN, qu'elle soit causale ou simplement marqueur. La SAM est d'autant plus intéressante que la sélection classique, reposant sur les phénotypes, est peu efficace, c'est-à-dire quand les caractères sont difficiles ou coûteux à mesurer (caractère non exprimé, ou limité à un sexe, ou exprimé tard dans la vie : mesure invasive comme une infection expérimentale ou une mesure après l'abattage), quand les performances individuelles apportent peu d'information (caractère peu héritable, déterminisme récessif ou à pénétrance faible), ou plus généralement quand l'approche polygénique a une efficacité limitée ou un coût élevé. En conséquence, la SAM est considérée comme particulièrement intéressante chez les bovins laitiers qui concentrent des conditions défavorables à la sélection conventionnelle : la plupart des caractères ne sont exprimés que chez les femelles, l'intervalle de génération est long, le testage sur descendance est une étape longue et coûteuse, les mères à taureau sont souvent sélectionnées sur information sur ascendance seulement, et enfin les caractères fonctionnels comme la résistance aux maladies ou la fertilité, avec une héritabilité faible, prennent une importance croissante dans l'objectif de sélection.

La SAM dépend de l'information moléculaire disponible. Trois étapes peuvent être distinguées dans la caractérisation d'un QTL.

- 1) Lorsqu'un QTL est cartographié, la position vraie du QTL est souvent mal connue et la distance entre les marqueurs et ce QTL peut être importante (>10 cM). Dans ce cas, le déséquilibre de liaison (ou association marqueur – QTL) présent à une génération donnée diminue rapidement en quelques générations.
- 2) L'étape de cartographie fine rétrécit l'intervalle de confiance autour du QTL. Les événements de recombinaison entre les marqueurs proches et le QTL sont rares et tout déséquilibre de liaison peut se maintenir dans la population sur de nombreuses générations.
- 3) Le gène en cause est identifié ainsi que le polymorphisme de l'ADN responsable du phénotype.

Ces trois situations conduisent à des possibilités de SAM très différentes en coût et en efficacité. La situation 3, notée MAS3, est la plus favorable. Souvent, un test simple suffit à prédire la valeur de l'individu, limitant considérablement le coût, qui peut cependant dépendre aussi du coût de licence de brevet.

A l'opposé, la première génération de SAM, dite SAM1, tire parti des résultats de primolocalisation de QTL. Dans les populations animales en race pure, en équilibre de liaison, il n'existe pas d'association préférentielle entre les allèles d'un marqueur et les allèles du QTL et il n'est donc pas possible de sélectionner pour certains allèles de marqueurs. Le DL, cependant, est présent intra famille et peut être utilisé en sélection. L'information marqueur est utilisée pour estimer la probabilité d'identité par descendance (PID) de segments chromosomiques d'individus apparentés. Dans le cas d'un gène majeur, ces PID permettent d'inférer le génotype de candidats à partir de ceux de leurs apparentés. Cette approche a été utilisée en France pour l'éradication de l'anomalie BullDog en race Holstein ou pour introgresser le gène « Sans Cornes » (Polled) dans une population Charolaise. Pour un QTL, on combine l'information QTL avec celles du pedigree et des phénotypes dans un index estimé par un BLUP assisté par marqueurs. La SAM1 présente des limitations importantes et un coût élevé. L'information n'est pas dans la nature des allèles marqueurs mais dans les transmissions entre parent et descendant qu'ils révèlent. Chaque effet de QTL est estimé à partir des performances de l'individu et de ses apparentés qui portent ce QTL en probabilité. Les marqueurs doivent donc être génotypés non seulement pour les candidats mais aussi pour des individus apparentés avec information phénotypique.

Quand le QTL est cartographié très précisément avec des marqueurs très proches, il existe des associations entre marqueurs et QTL. Les recombinaisons étant rares sur ce petit intervalle, les marqueurs sont maintenus en déséquilibre de liaison avec le QTL au niveau de l'ensemble de la population sur de nombreuses générations. L'efficacité de la SAM2 est très supérieure à celle de la SAM1, pour trois raisons : elle utilise une bien meilleure information de base (la position du QTL est connue précisément), les recombinaisons sont rares et la SAM2 utilise l'information entre familles. Au final, la SAM2 peut être aussi efficace que la SAM3, sans coût de propriété intellectuelle, même si elle est plus complexe à utiliser.

Chez les bovins laitiers français, un gros programme de SAM1 a été mis en place fin 2000 par un consortium réunissant l'INRA, LABOGENA et l'UNCEIA pour le compte de 8 unités de sélection dans les races Holstein, Normande et Montbéliarde. Quatorze régions chromosomiques de 5 à 30 cM ont été choisies à partir d'un programme de détection de QTL. Ces régions portent des QTL expliquant 8 à 20% de la variance génétique d'au moins un des caractères suivants : quantité de lait, de matière grasse, de matière protéique, taux butyreux, taux protéique, comptages cellulaires, fertilité femelle. Chaque région est suivie en moyenne par 3 à 4 microsatellites régulièrement répartis.

La population génotypée comprend deux types d'animaux, les candidats et leurs apparentés avec information phénotypique. Les candidats sont des jeunes mâles avant testage ou des jeunes femelles de forte valeur génétique dans les noyaux de sélection, avant reproduction. Les apparentés regroupent le père et la mère des candidats, tous les mâles d'IA dans le pedigree, et les demi-sœurs des candidats. Près de 10 000 animaux sont génotypés chaque année. Une évaluation génétique est réalisée chaque mois pour 8 caractères. L'évaluation est basée sur un BLUP mono-caractère multi-QTL.

Aujourd'hui, cette procédure permet des gains de précision (CD) de 0,05 à 0,19 selon les individus et caractères. En moyenne, la SAM identifie le meilleur candidat dans une fratrie dans 73% des cas. Au final, le gain de précision permet de diminuer de 10 à 20% le nombre de taureaux mis en testage sans perte de progrès génétique sur l'objectif de sélection. Ce résultat peut largement couvrir le surcoût de la SAM.

Le programme SAM génère une population ressource exceptionnelle pour la cartographie fine de QTL. L'idée, dès le départ, a été de construire une synergie entre SAM et cartographie de QTL. D'une part, la SAM fournit un grand nombre d'animaux bien caractérisés qui sont la ressource de base à la cartographie, d'autre part les progrès en caractérisation de QTL bénéficient directement à la SAM. Actuellement, 83 familles d'IA s'ajoutent au protocole initial de 14 familles. Au total, plus de 10 000 taureaux testés sont entrés dans le programme SAM et ce nombre augmente d'environ 1000 par an.

Dans un premier temps, trois chromosomes portant des QTL de production, résistance aux mammites et fertilité ont été ciblés (7, 15 et 26). Il est rapidement apparu plus rationnel de cartographier finement l'ensemble des QTL en rationalisant et industrialisant le travail de génotypage. C'est l'objectif du programme CartoFine en cours.

Le programme Genanimal CartoFine a été engagé pour cartographier l'ensemble des QTL, avec de nouvelles technologies de génotypage SNP. Accusant un sérieux retard dans son financement, il a évolué au cours du temps en fonction des technologies disponibles. Ce programme comporte deux étapes. Dans la première, 1800 individus sont génotypés par le CNG pour 7200 SNP des 14 régions QTL avec la technologie Illumina Infinium. Dans un second temps, 300 à 400 SNP seront choisis parmi les 7200 pour génotyper une population complémentaire d'environ 300 individus. Au final, l'ensemble des QTL devrait être cartographié finement au cours de l'année 2007, de façon à mettre en place dès 2008 une SAM rénovée, basée sur SNP uniquement, de type SAM2 ou SAM3 selon les QTL considérés.

VERS UNE IDENTIFICATION DES GENES DE RESISTANCE AUX MALADIES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

Edwige Quillet, R. Guyomard, F. Krieg, J. Garrigue, S. Le Guillou, S. Mauger, K. Tabet-Aoul
UR544 Génétique des Poissons, INRA, 78350 Jouy-en-Josas

P. Boudinot, M. Dorson
UR892 Virologie Immunologie Moléculaires, INRA, 78 350 Jouy-en-Josas

L'obtention de cheptels résistants aux maladies est un enjeu majeur pour le développement durable des filières aquacoles. Parallèlement aux mesures de prophylaxie et aux approches vaccinales et médicamenteuses, l'exploitation des résistances d'origine génétique constitue une des voies possibles de maîtrise de l'état sanitaire des poissons d'élevage.

Les travaux développés chez la truite arc-en-ciel dans ce domaine visaient (i) d'une part à identifier des ressources génétiques pertinentes pour l'étude des interactions hôte-pathogène et pour l'analyse du déterminisme génétique de la résistance/sensibilité à diverses maladies, (ii) d'autre part à repérer des polymorphismes potentiellement sélectionnables (QTLs) liés à la résistance aux maladies, et plus particulièrement la SHV (septicémie hémorragique virale).

Des lignées homozygotes de truite arc-en-ciel, récemment obtenues par le Laboratoire de Génétique des Poissons, ont été testées pour leur niveau de résistance à différents agents pathogènes, dont deux rhabdovirus, la SHV (septicémie hémorragique virale) et la NHI (nécrose hématopoïétique infectieuse). Ces lignées, génétiquement équivalentes aux lignées consanguines de souris, ont révélé une très large variabilité génétique de la résistance à ces deux virus, la survie variant de 0% à plus de 95% selon les lignées après une infection par bain. L'infection virale par injection abolit les résistances observées après balnéation, ce qui suggère un rôle important des tissus superficiels dans la résistance et des mécanismes de type 'barrière'. Couplées à l'utilisation de virus recombinants, les lignées ainsi identifiées offrent des opportunités tout à fait originales pour progresser dans l'identification des supports de la virulence du pathogène et la compréhension des mécanismes de réponse de l'hôte.

Un dispositif de primo-localisation de QTL de résistance à la SHV a été mis en place chez la truite, l'utilisation de descendances homozygotes (rendue possible grâce aux particularités de la reproduction chez cette espèce) améliorant la puissance du dispositif par rapport à des familles F2 normales. La densification de la carte génétique, menée en parallèle au sein du projet, a permis d'identifier une zone génomique très fortement associée à la résistance, que celle-ci soit mesurée directement (durée de survie après infection) ou par un critère indirect (prolifération virale sur explant de nageoire), confirmant ainsi le rôle des tissus externes dans la résistance observée.

Ces différents résultats ouvrent des perspectives importantes pour l'étude de la réponse aux pathogènes chez la truite, qu'il s'agisse de l'identification par cartographie fine des gènes impliqués dans la résistance à la SHV ou de l'utilisation des lignées homozygotes pour des analyses génétiques et fonctionnelles de la résistance à d'autres maladies. Les travaux dans ce domaine exploiteront les outils développés dans le cadre du programme AGENAE (banque de BAC, membranes ADN,...).

AGENAE 2002 – 2006 : BILAN DES PROGRAMMES REPRODUCTION

Ph. Monget

UMR85 Physiologie de la reproduction et des comportements PRC INRA-CNRS-Haras Nationaux-Univ. Tours , 37380 Nouzilly

Dans le domaine de la reproduction, sept projets principaux ont été financés (hors programmes sur la différenciation des gonades). Parmi ces projets, deux portent sur le mâle et quatre sur la femelle, et un sur les deux sexes. Un seul de ces projets se trouve dans le domaine générique, les autres étant co-financés par les partenaires privés.

Les deux projets portant sur la fertilité mâle consistent respectivement à identifier des marqueurs protéomiques de la qualité des spermatozoïdes au cours de leur transit dans l'épididyme, et à trouver des QTLs associés à la fertilité et à la qualité de la semence chez le taureau. Ces deux projets ont atteint au moins partiellement leur but et ont donné lieu à quelques publications. Ils ont en particulier permis de caractériser des marqueurs nouveaux associés à l'acquisition de la compétence gamétique mâle, et à identifier des QTLs responsables d'anomalies morpho-fonctionnelles des spermatozoïdes.

Trois projets sont spécifiquement tournés vers l'étude des mécanismes qui sous-tendent la baisse de fertilité des vaches laitières. Un des projets (Ovogenae) consiste à identifier des marqueurs spécifiques de la qualité ovocytaire chez la vache. Il a abouti à la mise en place d'une collection de nouveaux gènes spécifique de l'ovocyte, outil qui permettra dans un proche avenir d'identifier, au moyen de modèles in vivo et in vitro, ceux qui sont critiques pour la qualité de l'œuf. Les deux autres projets sont tournés sur l'impact du métabolisme dans la baisse de fertilité des vaches laitières. L'un d'eux (GA11) porte sur le rôle du métabolisme des lipides sur l'expression de gènes dans le tractus génital femelle. Le second projet (VLHP) s'intéresse au rôle de l'interface entre métabolisme et reproduction dans cette baisse de fertilité, mais s'attache également à identifier les QTLs et les gènes responsables de cette baisse de fertilité, essentiellement en race Holstein.

Les deux derniers projets sont plus atypiques. L'un des deux (Genovul) travaille sur le déterminisme génétique responsable de la variabilité du taux d'ovulation intra-espèce (étude et identification des gènes régulant le taux d'ovulation chez les brebis Booroola et Lacaune), et inter-espèces (transcriptome comparatif des cellules ovariennes de vache versus de truie). Le dernier projet s'attache quant à lui à rechercher de façon inédite et chez des lignées de souris recombinantes congéniques (porteuses d'environ 80% du génome d'une lignée consanguine et du reste d'une autre lignée) de nouveaux gènes impliqués dans la fonction de reproduction mâle et femelle, et de rechercher si les homologues bovins sont responsables de problèmes de fertilité dans cette espèce.

Au total, les premiers résultats obtenus dans les programmes les plus avancés sont très intéressants et seront probablement suivis par des données possiblement applicables sur le terrain en terme de sélection assistée par marqueurs et/ou de modification de pratique d'élevage.

PERSPECTIVES

Génomique, biologie intégrative, diversité génétique : quelles attentes pour l'élevage de demain ?

M. Douaire

**UMR 598 Génétique Animale, GAREn INRA-AgroCampus Rennes, 65 rue de St Briec 35042
Rennes CEDEX, France**

Les recherches en génomique visent en premier lieu à mieux comprendre le fonctionnement du génome et la régulation de son expression dans la complexité des relations entre ses différents constituants, entre les différents éléments cellulaires, et avec les informations extérieures (milieu). On aborde ainsi la biologie intégrative, domaine dans lequel de nombreux – sinon tous – composants d'un système biologique (gènes, protéines, métabolites, cellules, environnement) sont analysés conjointement, par opposition à une approche « réductionniste » dans laquelle chacun des éléments est étudié isolément. Les objectifs finalisés de ces recherches, dans le domaine des productions animales, concernent différents domaines parmi lesquels l'amélioration génétique, la gestion de la diversité animale, la maîtrise des conditions d'élevage (reproduction, alimentation, état sanitaire, bien être animal) dans des contextes socio-économiques définis, la valorisation technologique des produits en fonction de leurs caractéristiques biologiques.

Les apports actuels des programmes de recherche en génomique et biologie intégrative appliquées aux espèces animales ont été en partie illustrés par les résultats présentés auparavant dans ce séminaire. Ils ont été rendus possibles par le développement d'outils, de techniques et de méthodes appropriés et l'amélioration des connaissances rendue possible par ces développements. Nous sommes au cœur d'un processus évolutif dans lequel l'accroissement des connaissances génère de nouveaux besoins en outils, techniques, méthodes ; ces derniers, à leur tour, permettront d'apporter des réponses à des questionnements relatifs à l'amélioration de l'élevage et de ses débouchés.

Nombre d'outils développés ont concerné le génome : collections d'acides nucléiques (banques d'ADN), cartes génétiques de différentes nature jusqu'à la résolution extrême qu'est la séquence du génome, sans oublier les bases de données permettant l'exploitation de ces outils. Dans ce domaine, de nouveaux efforts sont encore nécessaires (variables selon les espèces) : il faudra poursuivre les programmes conduisant au séquençage vraiment complet des génomes et à son exploitation : analyse de leur structure et identifiant de polymorphismes (snp, cnv) ; annotation (identification des fonctions de différents segments), comparaison entre espèces, etc... Il faut noter que l'acquisition de tels outils se raisonne au plan international, mais qu'il est important d'y contribuer. De plus, la description « biologique » des outils ne doit pas masquer l'importance de la partie informatique : bases de données, outils de visualisation, d'interrogation, etc... Les outils acquis, en particulier ceux qui concernent le polymorphisme (snp, cnv) seront utilisés dans les domaines de l'amélioration génétique et de la gestion de la diversité. Pour cela, il sera nécessaire de développer de nouvelles méthodes d'évaluation génétique intégrant les informations de génotypage à l'échelle du génome, en plus des informations phénotypiques (ou à leur place ?).

Dans le domaine de la génomique fonctionnelle (transcriptome, protéome) les outils ne sont pas encore stabilisés, rendant nécessaire de suivre les évolutions technologiques et éventuellement de s'y adapter. L'appropriation et le développement de méthodes d'analyses statistiques (interprétation de résultats bruts) ou bioinformatiques (identification des acteurs et de leurs fonctions) sont encore nécessaires. Là encore, les acquisitions d'outils sont à raisonner dans un contexte international. L'intérêt des données de génomique fonctionnelle repose sur la possibilité de les analyser conjointement, mettant à jour leurs interactions. C'est le domaine de la biologie « intégrative », s'appuyant sur des méthodologies d'analyse de systèmes et de modélisation. Elles doivent être mises en oeuvre, en s'appuyant sur des méthodologies existantes à acquérir ou des développements méthodologiques nouveaux.

La résultante du fonctionnement du génome et des fonctions biologiques, en interaction avec l'environnement, se traduit par des phénotypes. Un effort particulier doit être fait pour leur mesure. Pour accroître la maîtrise biologique des caractères d'intérêt, il est nécessaire de les analyser dans

leurs différentes composantes. Il faut donc avoir accès à des phénotypes « élémentaires » en plus des phénotypes synthétiques classiquement mesurés. Il est aussi nécessaire de développer des méthodes de mesures automatisables, bien standardisées, pour être applicables à de grands nombres d'animaux relevant de structures différentes, pour les besoins de l'amélioration génétique notamment, mais aussi pour mettre en relation les différents niveaux d'étude (génome, transcriptome, protéome voire métabolome) avec leur signature phénotypique. Enfin, pour que les résultats puissent être rapidement exploitables, il sera judicieux d'obtenir ces phénotypes sur des populations commerciales, en développant au besoin des structures de mesures adaptées (stations de contrôle)

Enfin, il faut noter que l'évolution des connaissances générales sur les structures et les fonctionnements des génomes mettent en évidence leur grande complexité, parfois masquée par les simplifications réductrices qui ont dû être faites lorsqu'on ne disposait pas des moyens d'investigation actuels. Il faudra apprendre à évaluer et à utiliser ces composantes importantes du fonctionnement du vivant et de l'élaboration des caractères et des fonctions : la non additivité des effets, les transmissions génétiques non mendéliennes, les déterminismes épigénétiques, etc... Des recherches plus fondamentales doivent être développées dans ces domaines, sur ou pour les espèces d'intérêt en élevage, dont les résultats seront le socle des développements appliqués futurs.

Liste des participants