



## Le polymorphisme de l'ADN. Vous avez dit révolution ?

## DNA polymorphism - Did you say revolution ?

Par G. Guérin

*Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique. INRA-CRJ  
78352 Jouy-en-Josas Cedex.*

### Résumé

Le polymorphisme de l'ADN, d'abord considéré comme moyen complémentaire d'identification, se situe actuellement comme une véritable alternative aux autres méthodes basées sur les groupes sanguins et le polymorphisme des protéines. Les récents développements technologiques et notamment l'utilisation de marqueurs microsatellites permettent actuellement d'entreprendre la cartographie génétique des chevaux. Les retombées de ce type d'études sont considérables dans des domaines variés comme le contrôle de filiation, la diversité des populations et permettent également une approche génétique des performances.

**Mots-clés** : Cheval - Polymorphisme - Microsatellites - ADN - Cartographie génétique

### Summary

DNA polymorphism was first considered as a complementary mean for identification but is now more recognized as an alternative to other methods based on blood grouping and protein electrophoresis. Recent technological developments and especially the use of microsatellite marker allow us to envisage horse genetic mapping. This type of study is applicable to various domains such as parentage control, population diversity and allows a genetic approach to performances.

**Key-words** : Horse - Polymorphism - Microsatellites - DNA - Genetic mapping

## **I. LA NOTION D'IDENTIFICATEUR**

Nous sommes tous différents. Les chevaux aussi.

Ce postulat, satisfaisant pour l'esprit, demande néanmoins à être étayé par des preuves tangibles venant confirmer sa véracité et a donc plutôt servi de point de départ dans la recherche de la variabilité génétique. Ces preuves se trouvent sous la forme de critères de distinction qui doivent conduire, après une analyse appropriée, à l'identification des individus. L'objectif est donc de mettre en évidence des critères les plus nombreux et les plus différents possible entre les individus, afin d'améliorer notre pouvoir de discrimination. Il existe déjà un certain nombre d'identificateurs, comme le nom de l'animal, son numéro SIRE, son signalement, mais les critères les plus précis, infalsifiables et surtout ceux qui nous renseignent sur la généalogie sont des critères sanguins. Attardons-nous sur la notion de critère d'identification. Si un critère mesuré sur un individu peut prendre deux formes, par exemple A1 ou A2, les individus pourront être classés en deux catégories selon qu'ils possèdent la forme A1 ou la forme A2 - blanc ou noir - au même titre d'ailleurs que la population dont ils sont issus. Si maintenant on inclut un second critère qui peut également revêtir deux formes, B1 et B2, un individu se classera non plus selon deux, mais selon quatre types : A1B1, A1B2, A2B1 et A2B2. De même, les individus d'une population classés selon ces deux critères se répartiront en quatre groupes distincts. Une situation un peu différente mais aboutissant également à une répartition en quatre groupes, consiste à ne prendre qu'un seul critère présent sous quatre formes différentes A1, A2, A3 et A4. On conçoit ainsi, par extrapolation, que pour un nombre de formes fixé, c'est le nombre de critères qui augmentera le pouvoir de différencier les individus et que, plus un critère pourra revêtir de formes différentes, plus il sera discriminant. Transformons quelque peu la terminologie en remplaçant le critère par le locus (un site sur un chromosome) et les formes par les allèles (structures différentes d'un même locus) pour nous rattacher aux concepts de la génétique. Classiquement, le terme de polymorphisme génétique décrit une situation où, dans la même population, existent deux ou plusieurs allèles à un locus, chacun a une fréquence fixée arbitrairement au moins égale à 1%. Il faut savoir que la recherche et la caractérisation de loci - de marqueurs - polymorphes est étroitement conditionnée par une double réalité biologique et technique. Le problème se ramène donc à déterminer quel type de marqueur répond le plus à nos besoins et quelle technique va nous permettre d'y accéder.

## **II. L'EVOLUTION DES TYPES DE MARQUEURS PRIS EN COMPTE ET DES TECHNIQUES UTILISEES.**

Chronologiquement, ce sont les groupes sanguins avec les techniques sérologiques qui sont apparus les premiers, puis les protéines avec l'électrophorèse et, plus récemment, les diverses techniques de biologie moléculaire qui sont, comme nous le verrons, en évolution rapide et continue.

## **A. Les groupes sanguins**

Si l'étude des groupes sanguins humains remonte au début du siècle, la première publication significative sur les chevaux a été réalisée en France par L. Podliachouk en 1957 où dix agglutinines "naturelles" étaient décrites. La sérologie, utilisée conjointement dans différents pays, a permis de mettre en évidence sept systèmes génétiques de groupes sanguins (Mériaux 1992) représentés par une trentaine d'antigènes érythrocytaires reconnus au niveau international et bénéficiant, de ce fait, d'une nomenclature unifiée. Bien que ces techniques sérologiques soient encore largement utilisées avec efficacité, elles présentent néanmoins, comme toute méthode, certains inconvénients. En effet, la mise au point d'un réactif de groupes sanguins reste aléatoire et certains réactifs sont parfois difficiles à obtenir. Plus important encore, car incontournable, le nombre de réactifs, c'est-à-dire en réalité le nombre d'antigènes différents identifiables à la surface d'un globule rouge est limité, et il est vraisemblable que cette limite est aujourd'hui atteinte. Le travail sérologique consiste actuellement à reproduire des anciens réactifs pour maintenir une batterie performante et non plus à en produire de nouveaux afin d'augmenter l'efficacité en contrôle de filiation. De plus, l'analyse sérologique équine n'a jamais pu résoudre à elle seule l'ensemble de contrôles de filiation ; elle nécessite l'utilisation de systèmes complémentaires.

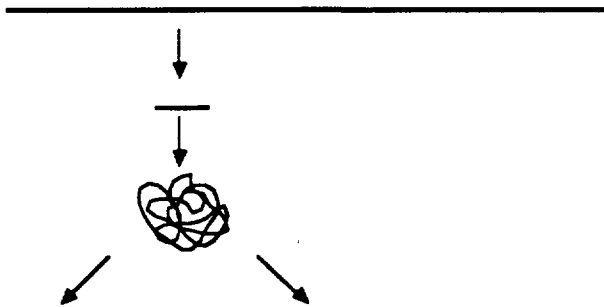
## **B. L'électrophorèse des protéines**

L'identification des individus par les groupes sanguins s'est enrichie d'une nouvelle voie d'approche du polymorphisme par l'étude des protéines par électrophorèse en gel d'amidon. Cette technique s'est ultérieurement diversifiée avec l'arrivée d'autres supports solides comme l'acrylamide, ainsi que par l'accroissement de l'éventail des protéines analysées. Contrairement aux antigènes érythrocytaires, ce nombre de protéines accessibles est beaucoup plus important, mais la plupart d'entre elles nécessitent des conditions électrophorétiques et de révélation spécifiques limitant concrètement leur utilisation. On peut considérer que l'optimum est actuellement atteint, avec dix systèmes utilisés en routine pour un total de 56 allèles (Mériaux 1992). Là encore, l'ajout de dix systèmes électrophorétiques aux analyses sérologiques ne permet pas de résoudre l'ensemble des cas de contrôles de filiation.

Par conséquent, des systèmes complémentaires ou même alternatifs doivent être mis en oeuvre si l'on veut résoudre ce problème. La figure 1 présente très schématiquement les différents types de marqueurs en fonction de leur représentativité du polymorphisme global. La molécule d'ADN contient par nature l'ensemble de l'information génétique. C'est à partir de ces milliards d'unités de base (les nucléotides) que vont s'élaborer, directement ou non, les autres structures biologiques, des protéines aux glucides en passant par les lipides, sans oublier les acides nucléiques eux-mêmes. On estime en général qu'environ 5% du génome est exprimé, les techniques sérologiques et électrophorétiques de protéines ne représentant elles-mêmes qu'une infime partie de ces 5%. Il apparaît ainsi qu'une avancée majeure serait accomplie si l'on pouvait s'adresser, non plus à ses produits, mais directement à l'ADN, en

utilisant préférentiellement une technique unique d'analyse. C'est l'approche qui se met progressivement en place depuis quelques années, après quelques tâtonnements.

**Figure 1. Le support et l'information biologique.**

	Le support		L'information
ADN (chromosome)			100%
ARN			
Protéines (glycoprotéines)			5%
Localisation	Membranaire	Soluble	
Type	Groupes sanguins	Intra-cellulaire Extra-cellulaire	
Méthode	Sérologie	Electrophorèse	Infime
Nombre	Limité 7 groupes	Limité 10 environ	

### C. Le polymorphisme de l'ADN

Il est apparu avec le temps que le polymorphisme n'était pas réparti de manière uniforme sur l'ensemble du génome, mais que certaines régions étaient plus variables que d'autres et que cette variabilité pouvait être de nature différente.

#### 1. Les régions variables du génome

Dans les années 1970, une étape importante a été franchie avec la découverte des enzymes de restriction fragmentant l'ADN en des sites précis. La technique de RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) consiste à visualiser, à l'aide de séquences complémentaires radiomarquées (sondes moléculaires), des fragments d'ADN génomique séparés selon leur taille par électrophorèse. La taille de ces fragments dépend de l'emplacement des sites de reconnaissance de ces enzymes de restriction qui peuvent, à la faveur de mutations ponctuelles, apparaître ou disparaître, créant ou détruisant un site (Fig.



multilocus. Ces minisatellites existent aussi chez les équidés et certains sont très efficaces mais leur utilisation est également freinée par une méthodologie et une interprétation parfois complexes, incompatibles avec des analyses en grand nombre (Guérin et al. 1993).

### b. Les microsatellites

Un pas décisif a été accompli avec la mise au point de la technique d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR: polymérase chain reaction, Saiki et al. 1988). Si elle a été appliquée avec succès à certains types de minisatellites humains, c'est avec la découverte de l'existence de répétition en tandem de dinucléotides appelés microsatellites qu'elle révolutionne la génétique moléculaire.

Les caractéristiques des microsatellites les situent actuellement comme les meilleurs marqueurs d'étude du génome des espèces animales. Ceci provient d'une série d'avantages à la fois technologiques et biologiques. Cette approche bénéficie en effet des avantages de la PCR, c'est-à-dire de l'amplification de séquences uniques d'ADN, en d'autres termes, de loci individuels. Elle diminue la quantité d'ADN initial nécessaire à l'analyse rendant possible le typage à partir de différents fluides biologiques comme par exemple le sperme ou l'écoulement nasal. De plus, le nombre de sites présents dans le génome est important (estimé à plusieurs dizaines de milliers chez l'homme), chacun ayant en moyenne un polymorphisme élevé (3 à 7 allèles). Notons que le génome équin serait très riche en microsatellites par rapport à d'autres espèces animales, ce qui constitue une situation d'investigation très favorable dans cette espèce. Actuellement, on dénombre seulement une cinquantaine de microsatellites caractérisés chez le cheval, ce qui est infime par rapport aux deux mille cinq cents utilisés pour établir, par exemple, la récente carte génétique publiée chez l'homme (Weissenbach et al. 1992). Ces marqueurs équins mis en évidence par Ellegren et al. (1992) sont en cours de caractérisation dans notre laboratoire (Guérin et al. 1994) et déjà utilisés en complément de la détermination de l'hémostype classique pour l'identification et le contrôle de filiation. Le polymorphisme des microsatellites leur confère une probabilité d'exclusion élevée et on atteint ainsi une valeur de 0,99 avec seulement une dizaine d'entre eux. Actuellement, les séquences caractérisées dans différents laboratoires sont comparées, afin de définir un panel international des microsatellites les plus performants. Le panel sera alors proposé aux différents laboratoires de typage qui pourront ainsi échanger des résultats d'analyse homogènes. Si la technologie actuelle fait appel à un marquage radioactif, la mise au point d'un typage à l'aide de fluorophores, par des appareils de séquençage automatique munis de logiciels spécialisés, est déjà en cours.

### 3. Vers d'autres méthodologies

C'est uniquement dans l'optique des contrôles de filiation que se situe l'initiative d'une société privée américaine, soutenue par le New York Jockey Club, de développer une méthode d'identification originale, basée sur le polymorphisme de mutations ponctuelles à plusieurs loci. L'option choisie a été de sélectionner une vingtaine de loci bialléliques, donc faiblement

polymorphes, et de développer conjointement une technologie de typage rapide par élongation de chaîne, éliminant ainsi la phase d'électrophorèse nécessaire aux mini et microsattellites. L'absence de publication décrivant en détail cette technique et son efficacité réelle nous empêche de l'évaluer dans des conditions de laboratoire. Attendons donc d'en savoir plus pour se faire une réelle opinion sur cette méthode.

C'est en tout cas la première fois qu'une organisation hippique, associée à une société privée, prend la décision unilatérale de typer une race de chevaux sur son territoire en absence de toute concertation internationale et de toute possibilité de reproduire à l'étranger l'hémotype d'un individu. Cette situation nouvelle est évidemment transitoire et, si l'on peut prévoir qu'à terme le typage des équidés se fera grâce aux techniques d'analyse de l'ADN, il est trop tôt pour prédire quelle méthode sera retenue et dans quel délai. De toute façon, une période intermédiaire sera nécessaire pour passer du typage actuel de l'hémotype par les groupes sanguins à une autre procédure qui reste encore à déterminer.

### **III. LES AUTRES APPLICATIONS DU POLYMORPHISME DE L'ADN.**

Le développement des marqueurs microsattellites ouvre assurément un grand nombre de domaines d'investigations, tant cognitives qu'appliquées.

#### **A. L'étude des populations**

Les populations animales se définissent par des critères morphologiques, parfois liés aux performances, et généalogiques les classant par race à l'intérieur d'une même espèce. Ces critères peuvent paraître insuffisants, d'où la nécessité de les compléter par des critères biologiques polymorphes. En effet, des index synthétiques permettent de situer des populations, des races, les unes par rapport aux autres, en évaluant la distance qui les sépare. Plusieurs études ont déjà été effectuées en Europe et aux Etats-Unis à partir du polymorphisme des groupes sanguins et des protéines. Ces études demandent à être complétées et affinées au moyen des microsattellites, qui sont des marqueurs de choix pour ce type d'étude. De même, la variabilité intra-population, qui renseigne sur l'homogénéité d'une race, peut également être abordée de cette manière.

#### **B. La cartographie génétique et ses applications.**

Nous abordons ici l'un des domaines où le terme de révolution prend sa signification la plus profonde. L'idée originale est que le nombre et le polymorphisme des microsattellites dans le génome permettent de le baliser sur toute sa longueur. Ces bornes régulièrement espacées sont autant de témoins qui indiquent si la région chromosomique où ils se trouvent recèle des gènes intéressants. Si la cartographie humaine est essentiellement orientée vers la recherche des gènes des maladies, les cartographies animales comportent surtout un aspect d'aide à la sélection. Les microsattellites, dans ce cas, doivent indiquer les régions du génome gouvernant des caractères quantitatifs (QTL: quantitative trait loci) qui pourront ainsi être favorablement

sélectionnés et dont les loci seront, à terme, identifiés et séquencés. Cette approche peut évidemment être appliquée au cheval et, même si elle ne nous donnera certainement pas le prochain quinté plus dans l'ordre, elle devrait nous fournir des indices nous permettant d'accéder aux bases génétiques des performances .

## CONCLUSION

L'utilisation des marqueurs génétiques équins a maintenant plus de trente ans d'existence et son évolution a toujours été conditionnée par les avancées technologiques successives. Les dernières années ont vu se réaliser des progrès techniques fulgurants qui nous ouvrent les portes du polymorphisme de l'ADN. Parmi les différentes techniques mises à notre disposition, certaines ont des domaines d'application plus étendus que d'autres, c'est le cas des microsatellites. Ainsi, ce n'est plus une infime partie du génome qui est accessible, mais son ensemble, dans sa structure, son fonctionnement et sa diversité. Vous avez dit révolution ?

A l'instar des recherches menées chez l'homme, des programmes de cartographie génétique des animaux domestiques sont en cours de réalisation comme par exemple chez les bovins, les porcs, les ovins et plus récemment la poule. Chez le cheval, la situation est très différente dans la mesure où de tels projets sont encore embryonnaires et que l'identification reste actuellement le principal moteur des recherches. Ces programmes, basés essentiellement sur l'utilisation des microsatellites, ont, de ce fait, des retombées considérables sur l'identification des individus et sur les contrôles de filiation. Cela explique pourquoi les microsatellites sont considérés comme outils de premier ordre par la communauté scientifique internationale, toutes espèces confondues .

Sachons également en profiter dans l'espèce équine, d'autant plus que ce génome présente une structure (caryotype, nombre de microsatellites) favorable à son étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ELLEGREN H., JOHANSSON M., SANDBERG K. and ANDERSSON L., 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet.* 23, 133-142.

GUERIN G., BERTAUD M., BILLOUD B. and MERIAUX J.C., 1993. A genetic analysis of variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in the horse. *Genet. Sel. Evol.* 25, 435-445.

GUERIN G., BERTAUD M. and AMIGUES Y., 1994. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HMS8. *Anim. Genet.* 25, (in press).

JEFFREYS A.J., WILSON V. and THEIN S.L., 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.



MERIAUX J.C., 1992. Contrôle de filiation et marqueurs sanguins chez les équidés. Recueil de Médecine Vétérinaire, Spécial Reproduction des Equidés. Novembre/Décembre.

PODLIACHOUK L., 1957. Les antigènes des groupes sanguins des équidés et leur transmission héréditaire. Thèse, Université de Paris, 102pp.

WEISSENBACH J., GYAPAY G., DIB C., VIGNAL A., MORISSETTE J., MILLASSEAU P., VAYSSEIX G. and LATHROP M., 1992. A second-generation linkage map of the human genome. Nature, 359, 794-801.