

27^{ème} journée d'étude

7 mars 2001

LES HARAS NATIONAUX

NOUVELLES PERSPECTIVES EN GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DANS L'ESPÈCE ÉQUINE

Par :

G. Guerin

INRA, Département de Génétique animale

Centre de recherche de Jouy

Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique

78352, Jouy-en-Josas cedex

Résumé

La sélection des chevaux, initialement fondée sur la connaissance empirique des éleveurs, a graduellement pris en compte des méthodes plus scientifiques. Le développement considérable de la **génétique moléculaire et de la cartographie** apporte actuellement de nouvelles connaissances sur les gènes influençant certains caractères. Chez le Cheval, des tests moléculaires sont déjà disponibles pour quelques gènes impliqués dans des maladies (Syndrome d'immunodéficience combinée, Hyperkaliémie paralysante périodique, Syndrome léthal du poulain blanc) et pour deux gènes de coloration de robe (Récepteur à la mélanocortine 1 et le Récepteur à l'endothéline B).

Ces progrès ouvrent de nouvelles perspectives de détection de maladies génétiquement transmissibles et d'une sélection tenant compte des résultats de tests moléculaires plus nombreux. On peut donc raisonnablement penser que la gestion des races équines fera de plus en plus appel à ces tests assortis d'un **conseil génétique** dispensé par un réseau de spécialistes afin de produire des animaux sains et mieux adaptés à la demande de la filière.

Mots-clés : Cheval - maladies - cartographie - gènes - conseil génétique

Summary

Horse breeding, first based on the empirical knowledge of horse breeders, has gradually incorporated more scientific methods. The extensive development of **molecular genetics and gene mapping** increases our knowledge on the control of traits at the gene level. In the horse, molecular tests are already available for a few diseases (Severe combined immunodeficiency disease, Hyperkalaemic periodic paralysis, Overo lethal white syndrome) and for two coat color genes (Melanocortin 1 receptor and Endothelin receptor B).

These progresses open new perspectives in the detection of genetic diseases and in a selection partly based on molecular tests. One can reasonably anticipate that the management of horse breeds will include these tests for **genetic counseling** provided by a network of specialists for producing healthier horses and populations more adapted to the breeder's demand.

Key-words : Horse - diseases - mapping - genes - genetic counseling

INTRODUCTION

Si la sélection naturelle s'est évertuée à éliminer les individus les moins aptes à survivre dans des environnements divers, la sélection humaine a plutôt cherché à augmenter, par croisement, le nombre d'individus présentant des caractéristiques jugées favorables. Cependant, les critères et les modes de sélection varient évidemment d'une espèce à l'autre pour tenir compte, d'une part, des nécessités économiques et sociales des propriétaires, et, d'autre part, des contraintes liées à la biologie de l'espèce.

Les premiers critères de sélection fondés sur l'observation et l'expérience des éleveurs, ont été progressivement affinés par les données plus scientifiques issues de la génétique quantitative et reposant sur l'évaluation mathématique des performances, comme par exemple les gains et le classement en course. Les indices synthétiques, largement mis à disposition du public, sont ainsi venus s'ajouter aux autres informations acquises par ailleurs pour décider des croisements. D'autres critères indirects de sélection issus de tests d'aptitude (allures, endurance, tests musculaires, tests biochimiques, etc....) sont également utilisés, ou en cours d'élaboration, pour répondre plus efficacement à la demande des éleveurs et des entraîneurs.

Depuis quelques années les progrès de la **génétique moléculaire** ont été spectaculaires, notamment chez les micro-organismes et la Souris pour des raisons fondamentales, mais aussi chez l'Homme pour identifier les gènes des maladies. Chez les animaux domestiques, ces développements ouvrent de larges voies d'application dans un domaine nouveau et en pleine expansion, celui de la sélection assistée par marqueurs. Des tests moléculaires simples effectués à l'intérieur, ou proche, du gène responsable d'un caractère, vont aider les éleveurs à produire des animaux plus sains ou ayant les caractéristiques recherchées en identifiant les individus porteurs. Encore faut-il disposer de ces tests, c'est-à-dire d'identifier les gènes responsables de ces caractères intéressant l'élevage. Pour cela, il faut impérativement obtenir et confronter deux types de données, celles du terrain et celles du laboratoire.

Les partenaires du terrain (vétérinaires, éleveurs, organismes d'élevage) sont les premiers à intervenir dans la chaîne pour récolter des données phénotypiques : le statut des animaux vis-à-vis des maladies génétiques, des données de radiographie pour les maladies ostéo-articulaires, la couleur de la robe, les performances, etc... Ces données de base sont essentielles car elles vont conditionner la création de fichiers à partir desquels la part des facteurs génétiques sera estimée. Elles permettent également d'identifier les animaux de référence dont le sang sera prélevé pour réaliser une étude d'association entre les marqueurs moléculaires et le caractère. Dans ce cas, des données familiales comme les descendants d'un même étalon sont préférables à des informations provenant de non-apparentés. Pour sa part, le travail de laboratoire consiste à trouver des marqueurs moléculaires sur l'ensemble du génome ou dans des gènes candidats. Enfin, c'est la confrontation des résultats de typage de ces marqueurs et du statut phénotypique des animaux de référence qui révélera ceux des marqueurs réellement associés au caractère. Dans ce cas, un test moléculaire permet d'identifier les individus porteurs ou à risque, vis-à-vis du caractère considéré.

Deux stratégies complémentaires sont actuellement développées par les généticiens moléculaires pour identifier les gènes d'intérêt. Le **clonage positionnel** consiste à repérer les régions du génome puis les gènes intervenant dans un caractère. Pour cela, il faut établir une **carte génétique**, c'est à dire localiser un grand nombre de marqueurs sur l'ensemble du génome. Ces points d'ancrage, semblables à des bornes kilométriques le long d'une route, sont utilisés pour se repérer sur le chromosome et ainsi déterminer la région où se situe le gène d'intérêt, étudier finement cette région en augmentant le nombre de marqueurs et finalement identifier le gène et la mutation à l'origine du caractère étudié. On recherche en fait l'endroit où a eu lieu l'accident : sur quelle route, à quelle distance de la ville, du village, à quel point kilométrique. On recherche la position du gène responsable du caractère par des techniques de clonage, d'où le nom de clonage positionnel.

La seconde stratégie utilise l'information phénotypique et moléculaire d'un caractère obtenu dans une autre espèce (l'homme, la souris ou une autre espèce domestique) pour l'appliquer au cheval. Par analogie, on fait l'hypothèse que les mêmes gènes sont en cause dans les deux espèces et on étudie en priorité ces gènes homologues chez le cheval. Cette méthode est appelée « **approche gène candidat** ». Elle oblige à comparer des caractères semblables, au niveau phénotypique puis moléculaire, chez des individus de différentes espèces.

Chez le cheval, les deux stratégies sont utilisées car elles sont souvent complémentaires. Les données de cartographie et la stratégie des gènes candidats ont déjà permis d'obtenir des résultats significatifs. **L'objectif est d'identifier des gènes d'intérêt pour l'élevage, comme les gènes de susceptibilité ou responsables de maladies et d'obtenir des tests moléculaires de dépistage pour aider les professionnels dans la gestion de l'élevage équin.**

Une collaboration internationale s'est engagée depuis plus de cinq ans pour appliquer les développements de la biologie moléculaire au génome équin. **Les techniques de génétique moléculaire** comme la production de marqueurs, l'élaboration de cartes génétiques, les banques d'ADN et le séquençage se sont développées pour identifier des gènes d'intérêt en élevage. Cette stratégie s'est déjà révélée efficace pour quelques caractères dont on connaissait bien le mode de transmission dans les familles comme l'hyperkaliémie paralysante périodique (HYPP), l'immunodéficience sévère combinée (SCID), le syndrome létal overo du poulain blanc (OWLS) et les couleurs de robe alezane et noire pour lesquels des **tests diagnostiques** sont déjà disponibles ou sur le point de l'être.

LA CARTOGRAPHIE DU GÉNOME

La construction des cartes du génome

C'est un ensemble de techniques destinées à localiser des marqueurs sur les chromosomes. Les marqueurs hautement polymorphes (microsatellites) sont ordonnés les uns par rapport aux autres en fonction de leur ségrégation familiale sur la **carte génétique**. Des cellules d'hybrides somatiques résultant de la fusion entre les cellules de cheval et celles d'autres espèces comme le hamster, sont utilisées pour classer les marqueurs en **groupes de synténie** qui correspondent aux chromosomes. La technique des **hybrides d'irradiation** est fondée sur le même principe, mais contrairement à la technique précédente, elle ordonne les marqueurs les uns par rapport aux autres, sur les chromosomes. **L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)** visualise la localisation de marqueurs fluorescents directement sur les chromosomes en métaphase, identifiés par un marquage différent. La **cartographie physique** consiste à aligner de grands fragments d'ADN obtenus au hasard dans le génome après avoir comparé leurs extrémités chevauchantes. Cette méthode est essentielle pour *in fine* identifier les gènes et les marqueurs dans une région donnée d'un chromosome et dans le séquençage complet du génome. Toutes ces techniques contribuent à l'élaboration de la **carte génomique**.

Les marqueurs

Ce sont essentiellement des marqueurs de l'ADN. Ils peuvent être anonymes comme les microsatellites ou identifiés comme les gènes. Les cartes construites à l'aide de marqueurs anonymes ne sont pas transposables aux autres espèces tandis que celles établies avec des gènes permettent de créer des liens entre génomes de différentes espèces, base de la **cartographie comparée**. Les informations cartographiques d'une espèce sont alors utilisées dans une autre par extrapolation.

LES APPLICATIONS

A. Les maladies

Les maladies ayant une origine génétique sont nombreuses mais celles dont la transmission est mendélienne simple, c'est-à-dire dépendant d'un seul gène non influencé par l'environnement, le sont beaucoup moins. Dans cette hypothèse d'une ségrégation simple, il faut signaler l'importance du statut dominant ou récessif du caractère. Si un caractère dominant est très vite détecté dans les élevages, l'apparition d'un caractère récessif est plus pernicieuse. Elle ne peut se révéler qu'après plusieurs générations lorsque le même allèle défectueux se retrouve en double dose (homozygote) chez un individu. Si cet individu peut être éliminé ou au moins écarté de la reproduction, aucun moyen ne peut distinguer chez ses ascendants les porteurs sains des individus non porteurs. Il est ainsi difficile de retrouver l'étalon chez qui la mutation s'est produite. L'ampleur de la dissémination de l'allèle défectueux dépend, on s'en doute, du nombre de descendants qu'il a engendré. Seuls des tests biochimiques ou moléculaires distinguent ces deux catégories de reproducteurs potentiels - porteurs sains des non porteurs - et permettent de gérer efficacement les croisements.

Parmi les maladies où le déterminisme génétique est total, on peut noter l'épidermolyse bulleuse, la maladie de Willbrand, l'immunodéficience sévère combinée, le syndrome du poulain blanc léthal, ou prépondérant comme le mélanome, la rhabdomyolyse, etc... Voici quelques exemples de maladies pour lesquels le gène et la mutation causale ont été identifiés :

L'hyperkaliémie paralysante périodique (HYPP)

C'est une maladie caractérisée par des épisodes de paralysie imprévisibles qui, dans les cas les plus sévères conduisent à une mort soudaine par arrêt cardiaque et/ou blocage respiratoire. Généralement, on observe des tremblements musculaires locaux ou généralisés et une faiblesse parfois associés à des bruits respiratoires dus à une paralysie des voies aériennes supérieures (larynx). Ces symptômes sont induits par le taux de potassium élevé dû à une réduction du potentiel membranaire des cellules musculaires chez les sujets atteints. L'HYPP est provoquée par une substitution d'un nucléotide dans la sous-unité alpha gène du canal sodique du muscle squelettique chez le cheval adulte. Cette maladie à déterminisme « dominant » existe chez l'homme et au sein de la race Quarter Horse dans laquelle on suspecte un effet fondateur. A l'origine, un étalon largement utilisé était porteur du gène défectueux et l'a transmis à sa nombreuse descendance. Il existe un test ADN de dépistage.

L'immunodéficience sévère combinée (SCID)

Elle affecte les poulains de race arabe qui présentent une déficience très prononcée en immunoglobulines et en lymphocytes B et T. Les poulains n'ont plus aucune défense immunitaire et meurent avant l'âge de 3 mois de diverses maladies infectieuses. Cette maladie est causée par une délétion dans une sous-unité d'un gène de kinase qui produit alors une protéine tronquée inactive. C'est une maladie à déterminisme récessif identique à celle observée chez la souris. Comme pour HYPP, un étalon atteint aurait transmis cette maladie à sa descendance. Un test ADN est disponible.

Le syndrome léthal overo du poulain blanc (OWLS)

Il atteint la descendance de certains chevaux de couleur pie. Les poulains blancs issus de parents pie overo meurent en quelques jours de complications dues à l'absence d'innervation végétative intestinale (maladie d'Hirschsprung chez l'homme). Le gène du récepteur à l'endothéline (EDNRB) est connu pour son implication dans la régulation du développement des cellules de la crête neurale qui deviennent les ganglions nerveux mésentériques et les mélanocytes. L'approche « gène candidat » a révélé la présence d'un allèle défavorable (Lys118) dû à une mutation remplaçant une isoleucine par une lysine en position 118 de la protéine endothéline. Un test ADN est disponible.

B. La couleur de la robe

La couleur de robe du cheval constitue un sujet très attractif et beaucoup étudié. Par analogie avec les données génétiques de la coloration de la robe chez la souris et d'observations visuelles dans des populations et dans des familles, des formules phénotypiques pour la plupart des patrons de coloration sont proposées chez le cheval. Des mutations dans certains gènes ont été identifiées pour plusieurs d'entre elles.

La couleur alezan

Une approche « gène candidat » a été utilisée pour identifier le gène du récepteur de la mélanocortine 1 (MC1R) comme le gène responsable de la couleur alezan chez les chevaux homozygotes (caractère récessif). Le séquençage du gène révèle une mutation unique d'un nucléotide modifiant un acide aminé de la protéine. Les chevaux porteurs du gène alezan sont détectés par un simple test ADN. Ce phénotype est à la base d'une des lois d'incompatibilité de filiation qui stipule que deux parents alezans ne peuvent avoir que des descendants alezans.

Le blanc léthal (OLWS)

La mutation du gène EDNRB (Ile118Lys) provoquant la mort des poulains (voir ci-dessus) est également responsable d'une des couleurs blanches de la robe. Contrairement à la couleur overo, le blanc léthal est un syndrome à caractère récessif. Jusqu'à présent, tous les parents de ces poulains sauf un ont un phénotype pie

ovéro. Cela laisse supposer l'existence d'un degré supplémentaire de complexité dans le déterminisme de la couleur ovéro.

La couleur noire

Suivant une approche « gène candidat », le gène agouti a été identifié comme responsable de la couleur noire des animaux à l'état homozygote (caractère récessif) par S. Rieder dans notre laboratoire. Le séquençage montre une délétion dans la séquence codante du gène modifiant profondément la taille de la protéine agouti, ce qui la rendrait inactive. Un simple test PCR permet d'identifier les chevaux porteurs de l'allèle « noir » et connaître le génotype réel des individus classés noirs.

C. La biodiversité

Le grand nombre de marqueurs produits par la cartographie du génome peut, par ailleurs, être utilisé pour estimer la variabilité intra et inter-populations. Le calcul d'index renseigne sur la structure de la population et permet de **comparer les races** pour une meilleure connaissance de la spécificité de chacune et de son évolution. Certaines études utilisent des marqueurs communs, ce qui permet une comparaison des races au niveau international.

CONCLUSION

Nous entrons dans une ère nouvelle de la génétique appliquée à l'élevage. Cette évolution sera d'autant plus rapide que l'ensemble des acteurs aura perçu l'immense valeur ajoutée potentielle que ces techniques peuvent apporter à l'élevage. Il faut être conscient que l'avenir se joue dès à présent, dans les laboratoires mais aussi sur le terrain. La petite taille et les faibles moyens des laboratoires de recherche sur le cheval les ont incités à entreprendre une collaboration internationale très active comme le montrent plusieurs publications rédigées en commun. Mais de nombreuses universités vétérinaires américaines accumulent des données cliniques sur des symptômes ou des maladies pouvant avoir une origine génétique, c'est-à-dire retrouvés dans la descendance de certains étalons, ce qui n'est apparemment pas le cas en France. De plus, les américains ont une « longueur psychologique d'avance » puisque l'idée de séquencer le génome équin a déjà été évoquée et semble avoir pris une place honorable dans la liste des espèces en attente de séquençage.

Les outils d'analyse moléculaire appliqués à la génétique équine sont en cours de mise en place et ont déjà révélé leur efficacité pour identifier un gène responsable dans un certain nombre de cas. Le nombre de test ADN est encore faible aujourd'hui, mais va considérablement augmenter dans le futur. Ces analyses moléculaires permettront d'identifier des chevaux porteurs de gènes d'intérêt pour l'élevage, notamment pour les caractères récessifs où il existe des porteurs sains. On peut raisonnablement penser que la gestion des races équines fera de plus en plus appel à des tests moléculaires et à un **conseil génétique** dispensé par un réseau de spécialistes pour améliorer la gestion des élevages et des populations. Cette nouvelle approche se pratique déjà dans certaines races et pour un nombre limité de caractères ; elle ne peut que s'amplifier au cours du temps au bénéfice de la qualité de l'élevage équin.