



HAL
open science

Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité du bovin

A. Bensaid, A. Kaushal, J.R. Young, S.J. Kemp, A.J. Teale

► **To cite this version:**

A. Bensaid, A. Kaushal, J.R. Young, S.J. Kemp, A.J. Teale. Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité du bovin. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1989, 20 (3), pp.389-394. hal-00901906

HAL Id: hal-00901906

<https://hal.science/hal-00901906>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Exposé de synthèse

Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité du bovin

A. Bensaid, A. Kaushal, J.R. Young, S.J. Kemp et A.J. Teale

International Laboratory for Research on Animal Diseases, PO Box 30709, Nairobi, Kenya

(reçu lors des journées d'animation scientifique du département de pathologie animale de l'INRA, Le complexe majeur d'histocompatibilité : structure et fonctions dans les différentes espèces, Maisons-Alfort, 14-15 septembre 1988)

complexe majeur d'histocompatibilité — réunion scientifique — structure — fonction

Genomic organization of major histocompatibility complex in bovine

major histocompatibility complex — scientific meeting — structure — function

Introduction

Dans le cas particulier de la souris, où des lignées syngéniques sont disponibles, une cartographie détaillée de certaines parties du H-2 a été établie par la technique de marche sur le chromosome. Néanmoins, cette technique nécessite que les gènes à cartographier soient relativement proches ce qui n'est pas le cas pour les gènes de classe I et du complément. Ce n'est que récemment qu'une liaison physique entre gènes de classe I et gènes du complément a été établie. Cette démonstration a fait appel à l'introduction de nouvelles techniques d'électrophorèse permettant de séparer, en fonction de leur taille, des fragments d'ADN

de plusieurs centaines de kilobases. Cette nouvelle approche a été particulièrement fructueuse chez l'homme où les distances intergéniques au niveau du CMH sont plus importantes que chez la souris. Ainsi une carte de liaison du HLA sur 3 millions de paires de bases a été établie. Elle comprend les gènes de classe II, les facteurs C₂ et C₄ du complément, les facteurs de nécrose des tumeurs et les gènes de classe I B et C. Néanmoins, si les gènes de classe I A et E sont liés mais séparés par 300 kb, leur distance par rapport aux gènes de classe I B et C est inconnue. Toutefois, sans l'aide de la génétique classique ou de la biologie moléculaire conventionnelle, les résultats mentionnés ci-dessus n'auraient aucune valeur formelle. C'est dans un tel contex-

te, sans information sur le nombre de loci codant pour les antigènes de classe I bovins, mais avec quelques indications sur les gènes codant pour les antigènes de classe II, qu'une tentative de cartographie du BoLA à l'échelle de la mégabase a été entreprise. Dans ce but, une stratégie et une technologie quelque peu différentes de celle employée chez la souris et l'homme a été appliquée. Pour rappel, le CMH bovin se compose de deux régions codant respectivement pour les antigènes de classe I et de classe II. 23 allospécificités de classe I ont été internationalement reconnues et sont nommées *w*, sans que l'on soit pour autant certain qu'elles sont codées par un seul locus. Les allospécificités nommées *KN* et cités dans cet exposé sont trouvées en Afrique de l'Ouest et de l'Est mais très peu représentées en Europe. Les antigènes bovins de classe II sont divisés en deux sous-régions, *DR* et *DQ* chacune contenant des gènes alpha et bêta.

Stratégie et méthodologie

Les mutants de délétion : cellules de choix pour l'étude d'hétérozygotes

Il est connu depuis longtemps qu'une irradiation de type gamma induit préférentiellement de large délétions d'ADN au sein du génome. Il s'ensuit un réarrangement du, ou des chromosomes affectés aboutissant, soit à la soudure des morceaux d'ADN cassés mais non délétés, soit à la translocation de fragments d'ADN sur un autre chromosome. Il est également établi que la probabilité est très faible pour qu'une cassure se produise au même endroit simultanément sur deux chromosomes homologues. Ainsi, pour le cas d'une cellule hétérozygote, si la délétion

chromosomique affecte une partie du génome codant pour une protéine polymorphique, deux populations cellulaires réciproques devraient être observées, correspondant à la perte d'un phénotype (ou d'une forme allélique) mais à la rétention de l'autre. En réalité ces deux types de cellules ne représentent qu'une portion très faible des cellules en présence, la majorité ayant gardé l'expression des deux formes alléliques existant avant la délétion. Par conséquent, il est très difficile d'avoir accès aux cellules mutées par clonage direct. Le critère de sélection employé dans cette étude sur les antigènes de classe I du CMH fait appel à l'utilisation d'anticorps monoclonaux (MAC) spécifiques d'un allèle donné. Les cellules irradiées sont incubées avec ces MACs en présence de complément. Deux MACs, *IL-A4* et *ILA-5*, respectivement spécifiques pour les allèles *BoLA-w10* et *BoLA-KN18* ont été utilisés pour lyser les cellules ayant gardé le phénotype parental et les cellules exprimant l'allèle reconnu par le MAC utilisé. Ainsi, à partir d'un clone parental, *Cl 14* ayant pour phénotype *BoLA-w10+/KN18+*, deux clones mutants, *17.1* et *7/21* de phénotypes respectifs *BoLA-w10-/KN18+* et *BoLA-w10+/KN18-* ont été sélectionnés.

Par ailleurs, des animaux consanguins obtenus par croisements frères x sœurs ont été sélectionnés sur la base de leur homozygotie pour leur CMH. Plusieurs génomes d'haplotypes à l'état homozygote ont été analysés (*w10* et *KN12* entre autres). L'ADN de ces animaux présente l'avantage d'être homogène et l'interprétation des résultats en est d'autant plus simple.

Electrophorèse de grands fragments d'ADN

Les méthodes classiques de purification d'ADN en milieu liquide ne sont pas

appropriées à l'obtention de molécules intactes. Pour cette raison, les clones sont mélangés à de l'agarose à basse température de fusion puis versés dans des moules de (5 x 6 x 1) mm. Après solidification, les blocs d'agarose sont incubés pendant 48 h à 50°C dans un tampon contenant du SDS et de la *protéinase K*, puis lavés extensivement. A ce stade, les blocs d'agarose contiennent des molécules d'ADN de très haut poids moléculaire. Les fragments d'ADN plus courts sont obtenus en incubant les blocs d'agarose avec des enzymes de restriction. Au cours de cette étude, trois enzymes de restriction (SfiI, NotI et MluI) ont été retenues. Leur particularité est de couper l'ADN à des sites peu représentés dans le génome des mammifères. Les tranches d'agarose contenant les fragments de restriction sont ensuite déposées dans les crevasses d'un gel d'agarose à 1% (24 x 22,5 x 0,6 cm). La cuve d'électrophorèse est une cuve normale à électrodes parallèles et permettant la recirculation du tampon (0,5 x TBE). L'électrophorèse dure 28 h avec des inversions périodiques du champ électrique à voltage constant (280 V). Pendant l'électrophorèse, la période varie suivant un gradient linéaire contrôlé par un ordinateur (BBC, Arcon). Par exemple, les conditions expérimentales permettant une séparation de fragments d'ADN de 20 à 1 000 kb sont les suivantes : au début de l'électrophorèse le courant passe «en avant» pendant 3 secondes puis il est inversé pendant 1 seconde; à la fin de l'expérience (28 h), le courant passe en avant pendant 36 s puis en arrière pendant 12 s. Cette technique développée par Carle & Olson a d'abord été appliquée pour séparer des chromosomes de levure. Dans notre laboratoire, nous utilisons des chromosomes de trypanosomes, (*T. brucei*) comme marqueurs de poids moléculaire. Après électrophorèse, les fragments de restriction

sont transférés sur des filtres de nylon puis sondés avec des gènes HLA de classe I ou de classe II.

Résultats expérimentaux : Cartographie du CMH

Les gènes de classe I

En utilisant l'enzyme NotI, deux fragments de 650 et 1 000 kb sont révélés sur le clone parental Cl 14. Il en est de même pour un homozygote BoLA-w10. Par contre, un seul fragment de 650 kb est présent sur le mutant 17.1 alors que 7/21 montre 3 fragments de 1 000, 650 et 300 kb. Ces résultats suggèrent que les gènes BoLA-w10 et KN18 se trouvent respectivement sur les fragments de 1 000 et 650 kb. De plus, l'homozygote possédant aussi un fragment de 650 kb, les gènes de classe I sont compris sur une longueur maximum de 1 650 kb (1 000 + 650 kb). Les résultats obtenus avec l'enzyme SfiI confirment que la région de classe I du CMH est en fait une famille multigénique. Ceci est illustré chez l'homozygote sur lequel SfiI clive le CMH en 6 fragments différents de 250 à 50 kb (Tableau I). Ils sont également détectés chez l'hétérozygote qui, par ailleurs, possède deux fragments supplémentaires de 340 et 160 kb. L'analyse des mutants de délétion montre que les fragments de 340 et 160 kb appartiennent à l'haplotype KN18 alors que les fragments de 250, 180, 120 et 50 kb proviennent de l'haplotype w10. Par contre, les fragments de 100 et 60 kb ne sont jamais délétés et donc devraient être représentés sur chacun des haplotypes sur une région chromosomique différente de celle codant pour les allospécificités. Avec l'enzyme MluI, trois fragments de 500, 140 et 120 kb sont obtenus chez

Tableau I. Fragments de restriction s'hybridant avec la sonde de classe I humaine HLA-B7.

Enzyme	Animal ou clone type BoLA			
	E98 w10+/w10+	Cl 14 w10+ /KN18+	17.1 W10-/KN18+	7/21 w10+/KN18-
Sfil	–	340	340	–
	250	250	–	250
	180	180	–	180
	–	160	160	–
	120	120	–	120
	100	100	100	100
	60	60	60	60
	50	50	–	50
Mlul	500	500	500	500
	–	150	150	–
	140	140	–	140
	120	120	–	120
NotI	1 000	1 000	–	1 000
	650	650	650	650
				350

Les chiffres indiquent la taille des fragments en kb. (–) indique qu'un fragment trouvé sur le Cl 14 est absent chez l'animal ou le clone correspondant. E98 est un animal consanguin homozygote pour son CMH.

l'homozygote, alors que l'hétérozygote montre un fragment supplémentaire de 150 kb. Le mutant de délétion 17.1 possède tous les fragments mentionnés à l'exception de ceux migrant à 140 et 120 kb. La position relative des «petits» fragments générés par Sfil ou Mlul, par rapport aux fragments long générés par Mlul ou NotI, est appréciée en réalisant des doubles digestions. Dans tous les cas, une double digestion a pour conséquence de provoquer la disparition des fragments de haut poids moléculaire. Eventuellement, de nouveaux fragments de poids moléculaire plus petit apparaissent.

Ainsi, la plupart des fragments générés par Sfil sont inclus dans le fragment géant généré par NotI à l'exception des

fragments de 180 et 340 kb qui sont coupés par NotI. Les plus grands fragments générés par Mlul sont entièrement inclus dans les fragments de 1 000 et 650 kb produits par NotI alors que le fragment Mlul de 120 kb possède un site pour NotI.

Donc, tout fragment possédant un site pour NotI se trouve à une extrémité ou l'autre du complexe. Il est donc possible de conclure que les gènes de classe I du CMH s'organisent en deux sous-ensembles de 1 000 et 650 kb. Le plus grand fragment, codant pour les allospécificités BoLA-w10, se divise lui-même en deux sous-ensembles. Le premier groupe de ces gènes se trouve à une extrémité du fragment de 1 000 kb alors que le deuxième groupe de gènes est inclus au

sein de ce grand fragment. Néanmoins, la distance relative entre ces deux groupes de gènes reste encore inconnue.

Les gènes de classe II

La cartographie des gènes DR et DQ du CMH bovin s'est révélée plus aisée que pour les gènes de classe I. En effet, les sondes humaines utilisées dans cette étude sont locus-spécifiques pour les gènes bovins équivalents. La même stratégie précédemment décrite a été employée mais dans ce cas, seul l'ADN d'animaux homozygotes a été analysé. Les sous régions DR et DQ sont toutes deux présentes sur des fragments géants de plus de 1 000 kb générés par MluI et NotI. L'enzyme SfiI clive le complexe de manière différente suivant les animaux utilisés. Dans tous les cas un fragment de 1 200 kb ou 350 kb porte un tandem formé par un gène DR alpha et un gène DR bêta. Pour l'haplotype w10 d'autres gènes DR bêta sont présents avec les gènes DQ alpha et bêta sur un même fragment de 300 kb. En double digestion avec les enzymes SfiI et NotI, ce fragment de 300 kb est raccourci de 50 kb mais porte toujours les gènes DR bêta et DQ alpha et bêta. Chez les animaux homozygotes pour l'haplotype KN12, l'enzyme SfiI génère deux fragments de 50 et 170 kb sur lesquels sont respectivement présents le deuxième sous-groupe de gènes DR bêta et les gènes alpha et bêta de la région DQ. Par contre il n'a jamais été possible d'individualiser les gènes DQ alpha des gènes DQ bêta indiquant leur proximité. Ainsi, l'organisation des régions DR et DQ chez le bovin est comparable à celle trouvée chez l'humain. Ces deux régions, DR et DQ, sont étroitement liées et mesurent respectivement 200 et 170 kb.

Liaison entre gènes de classe I et gènes de classe II

Aucun des fragments générés par les trois enzymes utilisées dans cette étude n'a hybridé simultanément avec les sondes de classe I et de classe II. Ce résultat indique que ces deux sous-régions du CMH sont distantes d'au moins 500 kb. Néanmoins, il est possible d'apprécier la liaison de ces deux régions en effectuant des études de familles. Les profils électrophorétiques des fragments révélés par la sonde de classe I sont toujours en corrélation avec les fragments révélés par les sondes de classe II. Néanmoins, si cette remarque est vraie quand on s'adresse à des familles, il n'y a pas de règle générale quand on analyse des populations non apparentées. En effet, les profils électrophorétiques entre gènes de classe I et de classe II sont alors différents. Ce résultat implique également qu'il existe des phénomènes de recombinaison entre les régions de classe I et de classe II du CMH.

Références

Pour l'introduction

Duham I., Sargent C.A., Trowsdale J. & Campbell R.D. (1987) Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel electrophoresis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 7237-7241

Pour la partie méthodologie

Carle G.F., Franck M. & Olson M.V. (1986) Electrophoretic separation of large DNA mole-

cules by periodic inversion of the electric field.
Science 232, 65-68

Orr H.T., Bach F.H., Ploegh H.L., Strominger J.L., Kavathas P. & De Mars R. (1982) Use of HLA loss mutants to analyse the structure of the human major histocompatibility complex. *Nature* 296, 454-456

Caractérisation des sondes HLA de classe II sur de l'ADN bovin

Anderson L., Bohme J., Peterson P.A. & Rask L. (1986) Genomic hybridization of bovine major histocompatibility genes. 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the *DQ-DR* region. *Anim. Genet.* 17, 195-204