



HAL
open science

Cartographie intégrée du microchromosome 16, porteur du complexe majeur d'histocompatibilité, chez la poule.

Sophie Leroux, Romain Solinhac, S. Galkina, Katia Feve, S. Derjusheva, E. Gaginskaya, Bertrand Bed'Hom, Alain Vignal, Valerie Fillon, Frederique Pitel

► **To cite this version:**

Sophie Leroux, Romain Solinhac, S. Galkina, Katia Feve, S. Derjusheva, et al.. Cartographie intégrée du microchromosome 16, porteur du complexe majeur d'histocompatibilité, chez la poule.. 8. Journées de la Recherche Avicole, Mar 2009, Saint-Malo, France. hal-01193434

HAL Id: hal-01193434

<https://hal.science/hal-01193434>

Submitted on 3 Jun 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.

CARTOGRAPHIE INTEGREE DU MICROCHROMOSOME 16, PORTEUR DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE, CHEZ LA POULE

Leroux Sophie*¹, Solinhac Romain*¹, Galkina Svetlana², Feve Katia¹, Derjusheva Svetlana², Gaginskaya Elena², Bed'hom Bertrand³, Vignal Alain¹, Fillon Valérie¹, Pitel Frédérique¹

¹UMR444 LGC, INRA-ENVT, 31326 CASTANET-TOLOSAN ; ² Saint-Petersburg State University, Oranienbaumskoie sch. 2, Stary Peterhof, SAINT-PETERSBURG, 198504, RUSSIE ; ³ UMR1236 GDA, INRA-AgroParisTech, 78352 JOUY-EN-JOSAS

* auteurs ayant également contribué au projet

RÉSUMÉ

Le caryotype de la poule comporte 78 chromosomes, dont 30 paires de microchromosomes, très riches en gènes, dont les plus petits sont peu ou pas représentés dans l'assemblage actuel de la séquence génomique de poulet. En particulier, le microchromosome 16 (GGA16) ne dispose que de 433 kb séquencés, pour une taille estimée à 12-15 Mb. Outre l'intérêt global pour les recherches de gènes majeurs et QTL (Quantitative Trait Loci) de disposer de marqueurs génétiques sur chaque portion de génome, nous avons entrepris une cartographie de ce chromosome parce qu'il est porteur du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), dont le rôle est central dans la réponse immunitaire. Chez la poule, il existe deux CMH fonctionnels, Y et B, génétiquement indépendants. Ces complexes sont localisés sur GGA16 avec les ADN ribosomiques (NOR, nucleolus organizer region), mais le positionnement relatif de ces régions est inconnu. Le but de ce programme était de déterminer cette organisation chromosomique et de développer des marqueurs génétiques sur ce microchromosome, qui en est très peu pourvu. Une banque de BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) a été criblée pour obtenir de nouveaux marqueurs de GGA16 après séquençage. Les marqueurs développés ainsi et par cartographie comparée ont permis de construire une carte génétique et une carte physique - grâce à un panel d'hybrides d'irradiation - du microchromosome 16. Les BAC sélectionnés ont été utilisés pour effectuer des expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence sur chromosomes en métaphase. L'intégration des cartographies d'irradiation, génétique et cytogénétique a permis de déterminer le positionnement relatif des complexes NOR, Y et B sur GGA16.

ABSTRACT

The chicken karyotype comprises 78 chromosomes, of which 30 pairs of gene-rich microchromosomes, of which 11 almost absent from the current chicken genome sequence assembly. Among them, the microchromosome 16 (GGA16) is particularly under-represented, with only 433 kb sequenced from a full size of about 12 to 15 Mb. Besides the obvious interest for QTL (Quantitative Trait Loci) mapping and major genes identification studies to have genetic markers available on every portion of the genome - which is not the case at present - we began a cartography of this chromosome because it carries the MHC (Major Histocompatibility Complex), the role of which is central in the immune response. In chicken, there are two functional MHC, Y and B, genetically independent. These complexes are localized on GGA16 with ribosomal RNA genes (NOR, nucleolus organizer region), but the relative location of these regions is unknown. The purpose of this program is to determine this chromosome organization and to develop genetic markers on this microchromosome, which is very poorly covered. We have developed markers to build a genetic and a physical RH (radiation hybrids) maps of GGA16, and screened a BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) library. Selected clones were used to perform FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) on chromosome metaphases. Integrating cytogenetics with RH and genetic maps allowed to determine the relative location of complexes NOR, Y and B on GGA16.

INTRODUCTION

Le premier assemblage de la séquence génomique de poulet a été publié en 2004, et réactualisé en 2006 (Hillier et al., 2004, <http://genome.ucsc.edu/>). Cet assemblage ne constitue pas une version achevée de la séquence complète du génome du poulet, notamment parce que 9 microchromosomes (sur 30) sont absents de cette version ; l'importance de ce problème se mesure avec plus d'acuité quand on sait que même si les microchromosomes ne représentent qu'environ 25% du génome de la poule, ils en portent 50% des gènes. Ces chromosomes étant d'autre part très peu pourvus de marqueurs génétiques, les recherches de QTL et gènes majeurs - qui nécessitent une couverture complète du génome - ne sont pas optimisées. D'autres microchromosomes, bien que présents dans l'assemblage, sont peu représentés ; c'est le cas du microchromosome 16 (GGA16), pour lequel on ne dispose que de 433 kb séquencés pour une taille estimée à 12-15 Mb. La connaissance de ce microchromosome revêt pourtant une importance capitale dans de nombreuses études, en particulier en pathologie et immunologie, puisqu'il est porteur du complexe majeur d'histocompatibilité. Ce complexe, séparé en deux entités physiquement indépendantes, B et Y, sur le chromosome 16 de la poule (Fillon et al., 1996), joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire. On rencontre également sur ce chromosome les régions organisatrices du nucléole (NOR, nucleolus organizer region), incluant les gènes des ARN ribosomiques (ADNr) ; les plus transcrits de la cellule, ils sont à l'origine de 50% de la production des ARN totaux. La taille de cette région est estimée à 6 Mb soit 40 à 70% du chromosome (Muscarella et al., 1985). Pour certains auteurs, l'indépendance génétique entre B et Y serait d'ailleurs due à la présence des ADN ribosomiques entre les deux complexes (Miller et al., 1996). Cette organisation du chromosome étant sujette à controverse, le double objectif de ce programme est d'apporter des éléments permettant de statuer définitivement sur l'ordre des complexes sur GGA16, et de développer des marqueurs génétiques de cette région, permettant d'intégrer ce chromosome important dans les futures recherches de QTL.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Développement de marqueurs

Le développement de marqueurs - c'est-à-dire l'obtention de couples d'amorces permettant d'amplifier de nouveaux fragments d'ADN localisés dans la région d'étude - nécessite de disposer de séquences situées dans cette région. Ce développement est réalisé soit en utilisant directement la séquence publiée, soit en recherchant des séquences a priori situées dans cette région, par criblage d'une banque de grands fragments (collection de clones

bactériens contenant chacun une fraction du génome de la poule) ou par cartographie comparée.

- Criblage de la banque de BAC

Le laboratoire possède la banque de BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) obtenue aux Pays-Bas (Crooijmans et al., 2000) qui couvre 5,5 fois le génome. Cette banque est composée d'environ 50 000 clones comportant chacun un fragment d'ADN génomique de poule de 130 kb en moyenne. Les clones sont organisés en mélanges pour en faciliter le criblage par PCR (test de la présence ou de l'absence du marqueur étudié dans chacun des clones). Douze marqueurs ont été choisis pour réaliser le criblage, soit parce que leur appartenance à un des trois complexes B, Y ou NOR était connue grâce à la séquence publiée, soit parce qu'elle a été déduite de leur position sur la carte d'irradiation (Tableau 1). Aux clones positifs - c'est à dire contenant un fragment d'ADN portant un marqueur a priori localisé sur le chromosome 16 - ont été ajoutés deux BACs pour lesquels la localisation sur le chromosome 16 était déjà connue : bw65G09, de la banque hollandaise, et CH261-97F21, commandé chez un fournisseur américain (BPRC, Auckland, Ca, USA). Les extrémités de la plupart de ces clones ont été séquencées (séquenceur ABI 3730) pour obtenir de nouveaux marqueurs.

- Cartographie comparée

Des segments chromosomiques, appelés groupes de synténie, sont conservés entre la poule et l'homme. Des marqueurs ont été développés à partir de zones du génome de la poule, non encore assignées à un chromosome, et homologues à des régions du génome humain potentiellement conservées sur ce chromosome (autour du CMH sur le chromosome 6 humain notamment).

1.2. Cartographie d'irradiation

Le panel d'hybrides d'irradiation (panel RH) a été mis au point au laboratoire (Morisson et al., 2002). Il se compose de 90 hybrides, constituant une collection de cellules de hamster contenant chacune une fraction différente du génome de la poule. Les marqueurs ont été génotypés sur le panel RH - test de leur présence dans chaque clone - deux fois en parallèle pour limiter les erreurs d'interprétation. Les conditions d'amplification PCR et de construction de la carte grâce à l'application Carthagene (De Givry et al., 2005) sont classiques (Douaud et al., 2008). Carthagène permet de localiser les marqueurs les uns par rapport aux autres, en calculant les probabilités des différents ordres. La carte dite "framework" est construite avec les marqueurs les plus fiables. Les marqueurs qui n'entrent pas dans cette ossature sont localisés en regard de celle-ci, à leur position la plus probable, formant avec les premiers la carte dite "compréhensive".

1.3. Cartographie génétique

La population expérimentale utilisée pour construire la carte génétique est issue d'un ancêtre Fayoumi et

est constituée de deux familles de demi-frères (père 1 x 5 mères : 115 descendants ; père 2 x 6 mères : 94 descendants). En fonction de la nature des marqueurs, les génotypes ont été obtenus par analyse du polymorphisme de longueur, ou par polymorphisme de conformation simple brin (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism). La carte génétique est construite en utilisant le programme CriMap version 2.4 (Green et al., 1990).

1.4. Hybridation *in situ* en fluorescence

Les hybridations *in situ* sont réalisées suivant un protocole classique (Fillon, et al., 1996). Brièvement, les métaphases sont préparées à partir de fibroblastes d'embryons de poulet de 9 jours. Les sondes, marquées en random priming par biotine ou digoxigénine, sont hybridées sur les lames entre 16 et 24h. Après révélation, les lames sont observées au microscope à fluorescence (Zeiss).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les 12 marqueurs utilisés pour le criblage de la banque de BAC ont permis d'identifier 4 clones positifs : bw523B09, bw257D05, bw258C05 et bw137G04. Les séquençages d'extrémités de ces BAC, les analyses de cartographie comparée et la séquence disponible ont permis de développer 49 nouveaux marqueurs de GGA16, intégrés dans la carte d'irradiation comprenant un total de 56 marqueurs, pour une taille de 253,5 centiRays (cR, (figure 1). Cette taille est proche de celle de GGA15 : 334 cR pour 13 Mb (Jennen et al., 2004), ce qui représente un ratio de 38,9 Kb/cR, entre la séquence et la carte d'irradiation. En utilisant ce ratio pour estimer la taille physique de GGA16 à partir de sa taille en centiRays - le ratio varie peu en fonction des chromosomes - on obtient environ 10 Mb, ce qui nous laisse supposer que la couverture du chromosome par

la carte RH n'est pas totale, puisqu'on sait que GGA16 est estimé entre 12 et 15 Mb.

L'information donnée par la position sur la carte (figure 1) de marqueurs pour lesquels l'assignation à l'un ou l'autre des complexes est connue (tableau 1) nous permet d'établir l'ordre : B-Y-NOR. Une carte génétique préliminaire (non présentée ici) donne un ordre similaire pour les trois complexes.

Parmi les 6 BAC retenus pour la cytogénétique (tableau 2), le BAC bw65G09 a été choisi comme témoin de localisation car il avait été précédemment assigné à GGA16. La FISH double couleur sur métaphases a démontré que les BAC associés à chaque complexe sont bien localisés sur GGA16 (figure 2a, 2b, 2c). On observe une multi-localisation de la sonde du Y formant des chapelets de fluorescence (figure 2d, 2e), qui laisse supposer une duplication de cette région, suggérant que la taille du CMH pourrait être plus grande qu'attendue. Le manque de résolution sur chromosome mitotique n'a pas permis de visualiser de manière certaine l'ordre des différents complexes. L'analyse suggère tout de même une organisation B-Y-NOR dans certains noyaux clairement observables (figure 2e), confirmant l'ordre établi par la carte d'irradiation.

3. CONCLUSION

Les résultats apportés par la carte d'irradiation et les observations cytogénétiques permettent d'assurer la position du complexe Y entre les complexes B et NOR, en contradiction avec les hypothèses précédentes. La nature de la séquence séparant les complexes B et Y est pour l'instant inconnue, et des expérimentations complémentaires sont en cours. La raison de la présence d'un événement de recombinaison obligatoire entre les complexes B et Y reste à élucider.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Crooijmans RP, Vrebalov J, Dijkhof RJ, van der Poel JJ et Groenen MA, 2000. Mamm Genome, (11), 360-363.
 De Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D et Schiex T, 2005. Bioinformatics, (21), 1703-1704.
 Douaud M, Feve K, Gerus M, Fillon V, Bardes S, Gourichon D, Dawson DA, Hanotte O, Burke T, Vignoles F, Morisson M, Tixier-Boichard M, Vignal A et Pitel F, 2008. BMC Genomics, (9), 129.
 Fillon V, Zoorob R, Yerle M, Auffray C et Vignal A, 1996. Cytogenet Cell Genet, (75), 7-9.
 Green P, Falls K et Crooks S, 1990. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.,
 Hillier LW, et al., 2004. Nature, (432), 695-716.
 Jennen DG, Crooijmans RP, Morisson M, Grootemaat AE, Van Der Poel JJ, Vignal A et Groenen MA, 2004. Anim Genet, (35), 63-65.
 Miller, M.M., R.M. Goto, R.L. Taylor, Jr., R. Zoorob, C. Auffray, R.W. Briles, W.E. Briles, and S.E. Bloom, 1996. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(9). 3958-62.
 Morisson M, Lemiere A, Bosc S, Galan M, Plisson-Petit F, Pinton P, Delcros C, Feve K, Pitel F, Fillon V, Yerle M et Vignal A, 2002. Genet Sel Evol, (34), 521-533.
 Muscarella DE, Vogt VM et Bloom SE, 1985. J Cell Biol, (101), 1749-1756.

REMERCIEMENTS

A l'unité PEAT (Pôle d'expérimentation avicole de Tours, INRA, Nouzilly), pour l'élevage des animaux, et à la Plateforme génomique de la génopole Toulouse Midi-Pyrénées, sur laquelle ont été effectués les génotypes.

Tableau 1. Marqueurs sélectionnés pour le criblage de la banque de BAC.

Le chr16_random est constitué de séquence assignée au chromosome 16 mais dont la position est inconnue.

Marqueurs utilisés pour le criblage	Assignation séquence 2006 (galGal3)	complexe	BAC positifs
SEQ1217	chr16:50745-51048	B	bw258C05, bw257D05
MCW0371	chr16:91098-91304	B	
SEQ0471	chr16:247712-248029	B	rien
SEQ1218	chr16:241882-242193	B	
SEQ0366	chr16:42589-42818	B	bw258C05, bw257D05
SEQ0099	chr16:51697-51883	B	
SEQ0113	chr16_random:221699-221875	Y (par déduction)	bw523B09
SEQ0106	chr16_random:87019-87180	Y	
SEQ0461	chr16:98986-299384	Y (par déduction)	
SEQ0365	chr16:351212-351397	Y	
SEQ0066	chr16_random:31833-32050	?	rien
SEQ464	chr1:104486671-104486853	NOR	bw137G04

Tableau 2. BAC utilisés pour la cytogénétique

complexes	Marqueurs de vérification des BAC	BAC obtenus	origine du BAC	séquençage d'extrémités
B	SEQ0366	bw258C05	criblage	Oui
B	SEQ0366	bw257D05	criblage	Oui
B	MCW0371	bw65G09	criblage	Oui
B	MCW0371	CH261-97F21	commandé	Oui
Y	SEQ0113	bw523B09	criblage	Oui
NOR	SEQ0464	bw137G04	criblage	Non

Figure 1. Carte d'irradiation du chromosome 16 de la poule. Comparaison avec l'homme.

- a) Les marqueurs frameworks sont présentés en correspondance avec leur position en centiRay. Les marqueurs à droite de la carte sont positionnés selon leur localisation la plus probable.
- b) Position (en Mb), sur les chromosomes humains (HSA), des marqueurs utilisés en cartographie comparée.

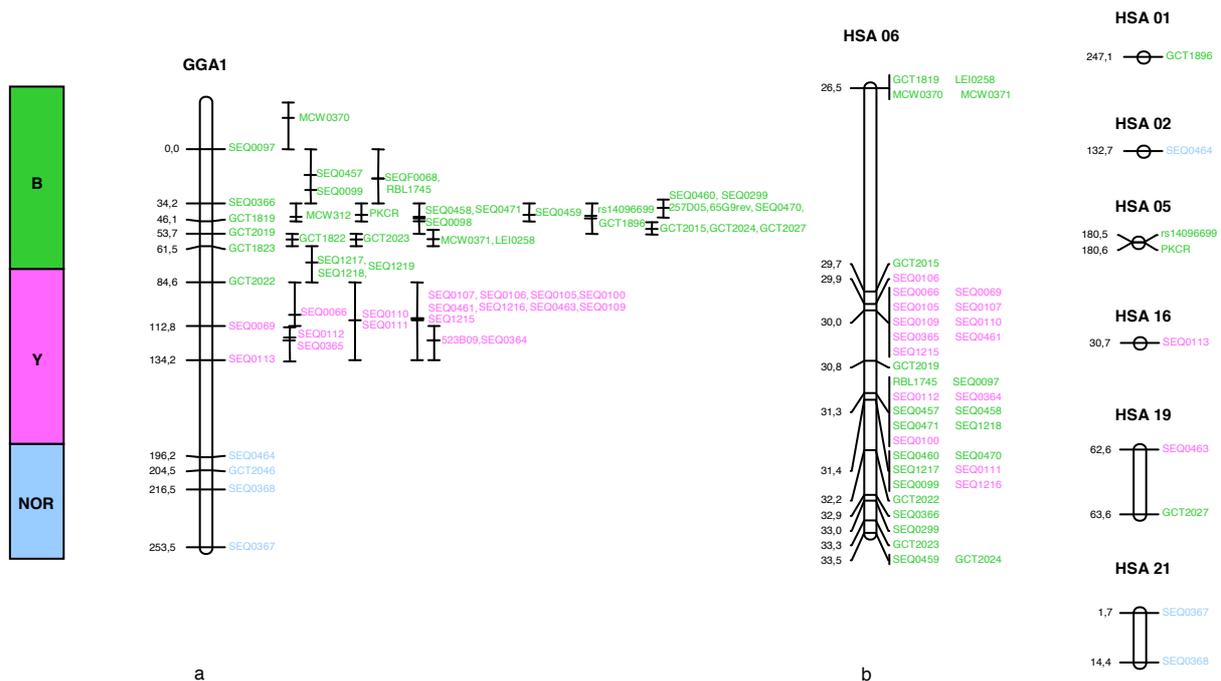


Figure 2 : Images d'hybridation sur chromosomes mitotiques et sur noyaux interphasiques
a : bw65G09 (complexe B en vert) et bw137G04 (complexe NOR en rouge) hybrident le même chromosome.
b : bw523B09 (complexe Y en vert) et bw137G04 (complexe NOR en rouge) hybrident le même chromosome.
c : bw523B09 complexe Y en vert) et bw65G09 (complexe B en rouge) hybrident le même chromosome.
d : bw523B09 (complexe Y en vert) et bw65G09 (complexe B en rouge) sont dans le même territoire nucléaire, bw523B09 hybride plusieurs fois la chromatine.
e : bw523B09 (complexe Y en vert), bw137G04 (complexe NOR en rouge) et bw65G09 (complexe B en rouge) sont proches dans le noyau, le complexe Y semblant séparer les complexes B et NOR.

