

4 - Recherche de gènes associés à des fonctions

E. P. CRIBIU, L. SCHIBLER, D. VAIMAN

INRA, Unité de Génétique Biochimique et de Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas cedex

e-mail : Edmond-Paul.Cribiu@biotec.jouy.inra.fr

Cartographie fine de la région du gène PIS de la chèvre

Résumé. Chez les Mammifères, la différenciation sexuelle résulte d'une cascade complexe dont le premier acteur est le gène SRY, porté par le chromosome Y, qui masculinise la gonade indifférenciée. Cependant, certains individus, en l'absence de SRY, présentent un développement testiculaire et une réversion du sexe. Chez la chèvre, par exemple, la réversion du sexe d'individus XX en l'absence du gène SRY ou d'autres séquences du chromosome Y est étroitement liée à l'absence de corne (mutation motte) puisqu'aucun recombinant n'a jamais été observé. Ce syndrome, nommé PIS pour Polled Intersex Syndrome, est causé par des mutations dans un ou deux gènes autosomiques que nous avons localisés dans un premier temps à proximité de deux marqueurs microsatellites d'origine bovine sur le chromosome 1 caprin. Les cartes génétique, cytogénétique et physique de la région ont ensuite été construites à l'aide, d'une part, de banques d'ADN issues de chromosome 1 trié, des bandes 1q42, 1q43 et 1q44 microdisséquées et de grands fragments (BAC) et, d'autre part, de la cartographie comparée avec les gènes ou EST (expressed sequence tags) localisés dans la région humaine homologue. Ces différentes approches ont permis de localiser le gène PIS au sein d'un contig de 1,5 Mb, dans une région de 100 kb autour d'un marqueur microsatellite.

Le PIS, ou polled-intersex-syndrome, est une anomalie couramment rencontrée chez les chèvres qui implique deux caractères phénotypiques dont les déterminismes factoriels sont très étroitement associés (aucun recombinant n'a été observé) : une absence de corne (motte ou polled en anglais) qui se transmet selon un mode mendélien monofactoriel autosomique dominant dans les deux sexes et une intersexualité chez les animaux de génotype femelle XX dont le mode de transmission est autosomique récessif.

Si l'absence de corne est un caractère à pénétrance complète affectant aussi bien les mâles que les femelles, l'intersexualité ne touche que les femelles génétiques homozygotes et se traduit d'une part par la stérilité et, d'autre part, par une masculinisation plus ou moins importante des organes sexuels. En effet, pendant l'organogenèse génitale, le PIS provoque une différenciation des glandes génitales indifférenciées en structures testiculaires qui vont ensuite sécréter les androgènes, responsables de la masculinisation de l'appareil génital interne (canaux de Wolff) et externe (clitoris et vulve). Le degré de masculinisation est très variable et, dans les cas extrêmes, certains individus peuvent être confondus avec des mâles normaux (Pailhoux *et al* 1994).

La caractérisation du gène ou de son produit protéique devrait permettre d'une part une meilleure compréhension des mécanismes de différenciation du cornage et des gonades et d'autre part de sélectionner des animaux sans corne qui soient fertiles.

Les stratégies développées pour réaliser le clonage du gène PIS s'appuient principalement sur la localisation génétique primaire du gène (familles ressources, marqueurs polymorphes et génotypage), la construction d'une banque de grands fragments de type BAC, l'établissement d'une carte comparée Homme/ruminant de la région, la construction d'une carte génétique à haute densité, l'élaboration d'une carte physique (contigs de BAC) et la recherche des gènes candidats positionnels et fonctionnels.

1 / Localisation primaire du gène

Cette première localisation a été réalisée en trois étapes comprenant :

- la construction des familles ressources

Ces familles sont constituées d'environ 600 animaux répartis en 12 familles de demi-frères/sœurs, le nombre de descendants variant de 9 à 72 avec, en

moyenne 1,2 descendant par femelle. Les croisements des 12 béliers hétérozygotes mottes avec des brebis homozygotes cornues ont permis de disposer d'un maximum de 293 méioses informatives. Par conséquent, un marqueur suffisamment polymorphe permet de détecter une liaison sur une distance de près de 25 à 30 cM du gène ;

- l'élaboration d'un panel de marqueurs polymorphes bien réparti sur l'ensemble du génome

Les marqueurs polymorphes ont été choisis parmi les microsatellites bovins et ovins disponibles dans la littérature ;

- le génotypage de ces familles

Le génotypage de tous les animaux a permis de lier génétiquement le gène à quatre microsatellites d'origine bovine (les deux marqueurs les plus proches étant à 5 et 9 cM) et donc de localiser le locus en région distale du chromosome 1 caprin (Vaiman *et al* 1996). Un cosmide contenant le marqueur microsatellite le plus proche a ensuite été hybridé sur la bande 1q43.

2 / Construction d'une banque de BAC

La banque caprine a été réalisée à partir de l'ADN d'une lignée cellulaire caprine 59 XY rob (6;15) cultivée au laboratoire. Elle comprend 61440 clones qui ont été repiqués en 640 plaques de 96 puits. La taille moyenne des inserts (fragments d'ADN) est de 150 kb, soit au total 3 équivalents génomiques qui assurent une probabilité de 95 % d'isoler n'importe quelle séquence unique. La banque a été organisée en 40 superpools de 16 plaques (40 x 1536 clones), ainsi que des pools de plaques (96 clones), de lignes (16 x 8 = 128 clones), et de colonnes (16 x 12 = 192 clones). Par conséquent, l'isolement d'un clone ne nécessite qu'une PCR de 76 échantillons.

3 / Etablissement de la carte comparée Homme/ruminant de la région

Les techniques de coloriage hétérologue (hybridation de sonde de chromosomes triés humains sur métaphases caprines) ont permis de constater que la partie médiane du chromosome 1 de la chèvre correspond à un fragment du chromosome 3 humain, les parties distales et proximales correspondant au chromosome 21 humain. La définition obtenue n'était, cependant, pas suffisante pour établir la correspondance entre la bande 1q43 de la chèvre et un fragment d'un des deux chromosomes humains. L'hybridation de BAC contenant des gènes localisés chez l'Homme a permis d'identifier la bande humaine homologue en 3q23.

4 / Etablissement de la carte génétique à haute densité

Quatre approches ont été utilisées pour construire la carte génétique fine de la région (Vaiman *et al* 1999) :

- **le tri des chromosomes bovins**, que nous avons réalisé en collaboration avec le CEA (Fontenay-aux-Roses). Les 900 chromosomes issus de la fraction correspondant aux chromosomes 1 et X ont subi une technique d'amplification LA-PCR qui a permis d'obtenir une cinquantaine de séquences microsatellites différentes appartenant au chromosome 1 bovin. Les marqueurs proches du PIS ont été sélectionnés pour être transposés chez la chèvre ;

- **les chromosomes grattés**, effectués par l'équipe de Manfred Schwerin (Dummersdorf, Allemagne) après grattage par micromanipulation sous microscope de trois exemplaires de la région 1q42 à 1q44 caprine. Les fragments de séquence obtenus après amplification par DOP-PCR ont servi à définir des amorces puis à cribler la banque de BAC caprine par PCR. Les BAC obtenus ont permis d'isoler huit nouveaux microsatellites dont trois en q43 ;

- **la cartographie comparée**, en criblant la banque de BAC avec des amorces définies dans les exons des gènes ou EST (expressed sequence tags) de la région humaine correspondante. Cette approche a permis d'isoler des microsatellites à partir des BAC contenant les gènes COP, SOX14, TFDP, NCK, ATP1B, CRBP1, et des EST ;

- **la cartographie physique** : les BAC, obtenus progressivement au cours de la construction d'un contig sur la région, ont été systématiquement sous-clonés, permettant d'isoler 16 microsatellites polymorphes supplémentaires.

Ces différentes approches ont permis de définir aussi précisément que possible l'ordre des marqueurs, à l'aide des informations génétiques par analyse des haplotypes des individus recombinants, des informations cytogénétiques, physiques et de la carte comparée (figure 1). Récemment, une association préférentielle du phénotype 'absence de corne' avec certains allèles de deux microsatellites produits à partir du contig (déséquilibre de liaison populationnel) a été observée. Le gène pourrait se trouver à une centaine de kb de ces marqueurs.

5 / Etablissement de la carte physique de la région d'intérêt

La banque de grands fragments a permis la réalisation d'un contig de BAC couvrant toute la région du PIS. Une stratégie de marche sur le chromosome a été entreprise à partir des loci localisés en 1q43 : les BAC chevauchants ont été isolés séquentiellement à l'aide des séquences d'extrémités et/ou des STS obtenus par sous-clonage. Au total, 90 BAC ont été isolés et intégrés dans six éléments de contig de 300 kb, 1 Mb, 1,5 Mb, 1 Mb, 500 kb et 300 kb, respectivement. L'observation de la séquence : un recombinant (ind 501), 0 recombinant, déséquilibre de liaison, 0 recombinant, 1 recombinant (individu 368), a permis de localiser le gène PIS au sein du contig de 1,5 Mb, dans une région de 100 kb autour du marqueur LSCV098 (figure 2, p 144).

Conclusions et perspectives

En combinant les données génétiques, cytogénétiques et physiques, il a été possible de définir avec précision une région humaine de moins d'une méga-

base susceptible de contenir l'homologue du gène PIS. Or, cette région a été identifiée comme contenant le gène responsable de la maladie génétique « Blepharophimosis-Ptoxis-Epicanthus inversus Syndrome » (BPES), associant une dysgénésie gonadique XX et une surproduction épidermique au niveau des paupières. Le clonage de ce gène n'a cependant pas encore été réalisé chez l'Homme, du fait du nombre restreint et de la taille réduite des familles disponibles. L'étude de ce gène chez l'Homme constitue un exemple illustrant l'intérêt des animaux modèles et de la carte comparée. En effet, la constitution de familles importantes n'étant pas limitante, la localisation génétique de ce type de gène peut s'avérer plus précise chez les animaux, facilitant les étapes de test d'éventuels candidats. Le contig de BAC caprin devrait permettre, d'une part, de tester d'éventuels candidats chez l'Homme et, d'autre part, d'isoler des séquences codantes caprines dont il s'agira de vérifier l'implication ou non dans le syndrome du PIS et du BPES.

Références

Pailhoux E., Cribiu E.P., Chaffaux S., Darré R., Fellous M., Cotinot C., 1994. Molecular analysis of 60, XX pseudohermaphrodite polled goats for the presence of SRY and ZFY genes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 491-496.

Vaiman D., Koutita O., Oustry A., Elsen J.M., Manfredi E., Fellous M., Cribiu E.P., 1996. Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn development in goats. *Mammalian Genome*, 7, 133-137.

Vaiman D., Schibler L., Oustry-Vaiman A., Pailhoux E., Goldammer T., Stevanovic M., Furet J.P., Schwerin M., Cotinot C., Fellous M., Cribiu E.P., 1999. High-resolution human/goat comparative map of the goat Polled/Intersex Syndrome (PIS) : the human homologue is contained in a human YAC from HSA3q23. *Genomics*, 56, 31-39.

Figure 1. Analyse d'haplotypes dans la région du PIS.

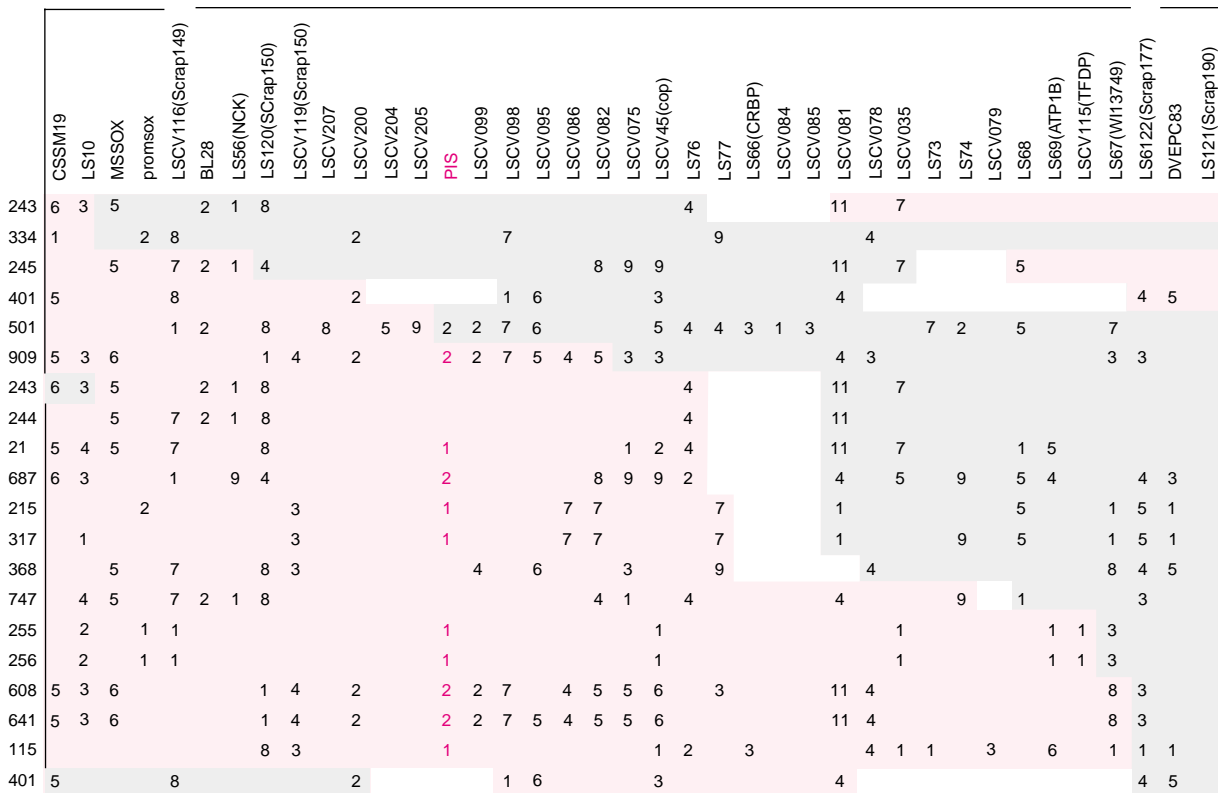


Figure 2. Contigs et marqueurs dans la région du PIS.

