

4 - Recherche de gènes associés à des fonctions

K. SAUNIER^{1,2}, R. JULIEN², H. LEVÉZIEL^{1,2}

¹INRA, Laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas cedex

²INRA/Université de Limoges, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences, 87060 Limoges cedex

e-mail : leveziel@biotec.jouy.inra.fr

Recherche des gènes impliqués dans la synthèse des antigènes du système du groupe sanguin C bovin (EAC)

Résumé. L'intérêt de l'INRA pour les systèmes de groupes sanguins bovins remonte à une quarantaine d'années. Les travaux et moyens engagés alors aboutirent à l'obtention de riches données sérologiques ainsi qu'à des données génétiques préliminaires. L'apparition des premières cartes génétiques permit ensuite la localisation de la plupart de ces systèmes. Néanmoins, la nature moléculaire des antigènes sanguins et leur rôle biologique demeurent méconnus. Nous avons choisi d'étudier le groupe sanguin C (EAC), système complexe très polymorphe, cartographié sur le chromosome 18 et codé par au moins deux gènes contigus. Des gènes candidats positionnels et fonctionnels qui pourraient coder pour EAC ont été définis. La construction, en cours, d'un contig de BAC bovins recouvrant la région de EAC, couplée à des analyses de liaisons génétiques a permis de cloner certains de ces candidats et de mieux délimiter la zone d'intérêt. La construction du contig doit être achevée et les candidats obtenus ainsi que les EST de la région devront être testés. Des expérimentations biochimiques viendront compléter et enrichir les données génétiques.

Chez les bovins, les informations relatives aux gènes de groupes sanguins sont essentiellement sérologiques : 78 motifs antigéniques différents ont été détectés par des anticorps monospécifiques hémolysants, produits et purifiés expérimentalement. Au plan génétique, il a été établi que la synthèse de ces divers antigènes est contrôlée par 11 systèmes indépendants, ces derniers étant utilisés quotidiennement pour l'identification des animaux et le contrôle de filiation. Néanmoins, les gènes correspondants n'ont pas, à ce jour, été caractérisés et rien n'est connu de leur séquence, leur structure, leur régulation ou leur fonction. Leur localisation dans le génome demeure encore imprécise, des informations de cartographie génétique acquises pour 10 d'entre eux ne les situant que par rapport à d'autres marqueurs (Kappes *et al* 1994, Eggen et Fries 1995). Chez l'Homme, pour des raisons médicales évidentes, la situation est tout autre : la majorité des gènes de groupes sanguins ont été localisés et caractérisés.

Dans ce contexte, où les informations concernant les groupes sanguins bovins sont encore préliminaires, l'apport des nouvelles techniques moléculaires ainsi que les acquis chez l'Homme ont relancé les travaux de recherche visant à caractériser les gènes impliqués dans la synthèse des antigènes détectés en sérologie.

Choix du système de groupe sanguin C bovin (EAC)

Le groupe sanguin C (EAC) constitue (Guérin *et al* 1981), avec EAB et EAS, l'un des trois systèmes

complexes très polymorphes, qui permettent à eux seuls de résoudre plus de 90 % des fausses filiations.

Dans le cadre d'une étude de cartographie génétique, il fallait d'une part constituer des familles dont les génotypes des groupes sanguins soient connus et, d'autre part, que ces génotypes soient informatifs. Dans les trois familles normandes de demi-frères-soeurs (3 géniteurs et 162 couples mère/produit) collectées pour cette étude, EAS était très peu informatif. À l'inverse, EAB et EAC l'étaient et de ce fait convenaient l'un comme l'autre. Ce sont finalement les données de la cartographie comparée qui ont orienté notre choix vers EAC, localisé sur le chromosome 18 bovin (ou BTA18) par Kappes *et al* (1994). En effet, d'après les résultats de peinture hétérologue (Hayes 1995), BTA18 correspond pour sa partie distale (de la position q22 au télomère) à la totalité du bras q du chromosome 19 humain ou HSA19. Or, HSA19 porte en q13.2 le gène LU (groupe sanguin Luthéran) et, en q13.3, un cluster de fucosyltransférases : FUT1 (groupe sanguin H) et FUT2 (groupe sanguin SE sécréteur), ainsi qu'une sulfo-transférase codée par le gène STD. Chacun des gènes cités constitue un candidat positionnel et fonctionnel valable pour le travail de caractérisation des antigènes contrôlés par EAC. Ajoutons que la région porcine du chromosome 6 (SSC6), équivalente à la région du BTA18 portant EAC, comporte elle aussi des gènes de groupes sanguins ainsi que les gènes FUT1 et FUT2 porcins (Meijerink *et al* 1997), mais qu'aucune identité entre ces groupes sanguins et ces gènes n'a été démontrée à ce jour.

Applications envisageables

Les épitopes présents à la surface des hématies se retrouvent également à la surface des cellules de nombreux tissus où ils jouent probablement un rôle important qui pourra être défini après leur caractérisation moléculaire. Ceci ouvrira alors de nouvelles perspectives de recherche comme, par exemple, mieux appréhender les mécanismes d'invasion et d'adhésion parasitaires (ex : colibacillose) pour les combattre, caractériser les mécanismes responsables des interactions cellulaires, expliquer le rejet de xénogreffons ou permettre la stabilisation et la fonctionnalité des protéines recombinantes en réalisant les modifications post-traductionnelles indispensables (dans les cas des glycosyltransférases). Une autre application serait de pérenniser les données d'expertises de filiations sérologiques accumulées depuis plus de 40 ans. En effet, ces techniques d'expertise sont actuellement en pleine modernisation (utilisation progressive des microsatellites en PCR multiplex et abandon des méthodes d'hémolyse), or, les nouveaux systèmes d'analyse sont sans rapport avec les anciens. Réaliser un lien entre les deux types de données, sérologiques et moléculaires, permettrait d'assurer la survie de l'information recueillie au travers de grands pedigrees d'élevage. L'étude de EAC permettra de développer l'expérience et les méthodologies nécessaires (stratégies, construction de divers outils moléculaires, acquisition de logiciels d'analyses et de savoir-faire, notamment en biochimie des membranes, etc.) pour aborder l'étude des autres systèmes sanguins et/ou tissulaires, constituant ainsi un modèle de choix.

Etat d'avancement des travaux

Pour valider et affiner la localisation génétique de EAC, une carte consensus partielle de la région télomérique du BTA18 a été construite. La ségrégation des allèles de 9 microsatellites encadrant le groupe sanguin (environ 2700 génotypages) a été analysée dans les trois familles décrites. Les résultats ont confirmé la position distale du locus EAC, déplacé de 30 cM vers le télomère par rapport à la position jusqu'alors admise. Grâce à deux marqueurs cartographiés physiquement, les cartes génétique et cytogénétique ont pu être intégrées, démontrant que la position physique apparente de EAC correspondait à la zone du HSA19 portant les gènes candidats. Enfin, une liaison étroite entre les marqueurs RM128, UWCA5, BM2078 et EAC a été mise en évidence, mais, de par la proximité des locus, il n'a pas été possible de déterminer précisément la position relative des uns par rapport aux autres (Saunier 1996).

Dans l'espèce bovine, nous disposons de peu d'informations concernant les gènes candidats : seul un segment de 760 pb du gène FUT2 bovin, cloné par B. Souchère (Unité de Génétique moléculaire animale, INRA/Université de Limoges), était décrit et avait permis une assignation à BTA18 grâce au panel d'hybrides somatiques caractérisé au laboratoire. Le criblage de la banque génomique de BAC caprine construite par L. Schibler (Laboratoire de Génétique biochimique et Cytogénétique, INRA Jouy-en-Josas) a permis d'isoler un clone contenant FUT2, celui de la banque de YACs bovine américaine n'aboutissant à aucun résultat. Ce BAC caprin a été cartographié par FISH en 18q24 distal (en posi-

tion distale à l'intérieur de la bande cytogénétique) par H. Hayes (Laboratoire de Génétique biochimique et Cytogénétique, INRA Jouy-en-Josas). Un autre BAC caprin contenant le microsatellite UWCA5 (situé à 4 cM de EAC) a lui aussi été localisé en 18q24 distal, permettant de conclure que le groupe sanguin EAC et le gène FUT2 étaient proches. Dans le but de localiser le gène FUT2 bovin sur la carte génétique par rapport à EAC, un polymorphisme bi-allélique par SSCP a été identifié. L'existence d'au moins un recombinant nous a interdit de conclure à la possible identité entre ces deux systèmes. Par la suite, l'hybridation moléculaire avec la sonde bovine FUT2, à faible stringence, des membranes à haute densité diffusées par le RZPD (The Resource Center of the German Human Genome Project, Berlin) pour cribler une banque de BAC bovine, a permis d'isoler deux nouveaux gènes de fucosyltransférases : FUT1 et Sec1. La séquence respective de chacun a été déterminée (celle de Sec1 par J.-P. Barraud, Unité de Génétique moléculaire animale, INRA/Université de Limoges), mais la recherche de polymorphisme est restée infructueuse. Cependant, un BAC de 90 kb, contenant simultanément les trois gènes a démontré leur organisation en cluster, donc leur liaison, comme observé dans l'espèce humaine. En parallèle, une sonde humaine LU (Luthéran) de 1,8 kb fournie par J.-P. Cartron (INSERM U76, GIP-INTS, Paris) nous a permis de cartographier ce gène chez le bovin en 18q24 distal, comme les deux systèmes précédents. Cependant, à défaut de trouver le moyen permettant d'isoler LU bovin et de le localiser génétiquement, la localisation des gènes APOE et APOC2, voisins de LU chez l'Homme, a été réalisée.

Nous avons alors débuté l'établissement d'un contig de la zone contenant EAC, grâce à la banque génomique de BACs bovine construite entre temps au laboratoire par A. Eggen (INRA Jouy-en-Josas) et au panel d'hybrides d'irradiation bovin 12 000 rads fourni par J. Womack (Texas A&M University, College Station, Texas, USA).

De nombreux gènes, localisés sur la carte humaine en 19q13.2-q13.3-q13.4 (région équivalente à celle du BTA18 portant EAC), ont été amplifiés chez le bovin par PCR hétérologue et positionnés sur le BTA18 à l'aide des hybrides d'irradiation ou grâce aux BACs du contig. Par cette approche, APOE et APOC2 ont été localisés dans une région apparemment distante du groupe sanguin C. Au contraire, les locus des gènes PRKCG, LAIR1, EFTF, LIM2, LHB, FUT 1/2, Sec 1, DBP en sont proches, enrichissant la carte comparée de la zone du groupe sanguin C.

Conclusion et perspectives

La construction du contig est en très bonne voie. En effet, la distance génétique de 4 cM ($Z = 11,7$) séparant les marqueurs microsatellites RM128 et UWCA5 correspond physiquement à 600 kb environ. La distance séparant RM128 et BM2078, marqueurs encadrant vraisemblablement EAC, est estimée à 2 cM ($Z = 14,1$). Logiquement, nous devrions aboutir, pour couvrir la zone où se trouve le locus de groupe sanguin EAC, à la construction d'un contig d'une taille avoisinant une mégabase. La cartographie comparée des gènes humains et des gènes bovins que nous avons isolés va, de plus, contribuer à identifier les éventuels remaniements chromosomiques

de la région, orientant ainsi favorablement le clonage positionnel de EAC. La recherche de microsatellites situés dans le contig est en cours, ainsi que l'isolement d'EST et d'autres gènes de HSA19 non localisés chez le bovin jusqu'ici. Dans le cas où un déséquilibre de liaison ne serait pas identifié avec les microsatellites isolés, la recherche de polymorphismes (SSCP ou SNP) sera entreprise afin de den-

sifier la zone d'intérêt en marqueurs informatifs. Enfin, pour faciliter la caractérisation du groupe sanguin C, des expérimentations biochimiques visant à définir la nature des antigènes détectés en sérologie sont également envisagées. Des hybridations en western-blotting de membranes de globules rouges avec les réactifs monospécifiques anti-F10/R1/C1 ont d'ailleurs commencé.

Références

Eggen A., Fries R., 1995. Integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Animal Genetics*, 26, 215-236.

Guérin G., Grosclaude F., Houlier G., 1981. The C system of cattle blood groups. 2. Partial genetic map of the system. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 12, 15-21.

Hayes H., 1995. Chromosome painting with human chromosome specific DNA libraries reveals the extent and the distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 72, 168-174.

Kappes S.M., Bishop M.D., Keele J.W., Penedo M.C.T., Hines H.C., Grosz M.D., Hawkins G.A., Stone R.T., Suden S.L.F., Beattie C.W.,

1994. Linkage of bovine erythrocyte antigen loci B, C, L, S, Z, R' and T' and the serum protein loci post-transferrine 2 (PTF 2), vitamin D binding protein (GC) and albumin (ALB) to DNA microsatellite markers. *Animal Genetics*, 25, 133-140.

Meijerink E., Fries R., Vogeli P., Masabanda J., Wigger G., Stricker C., Neuenschwander S., Bertschinger H.U., Stranzinger G., 1997. Two alpha (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q21 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and *Escherichia coli* F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome*, 8, 736-741.

Saunier K., 1996. Localisation génétique du système de groupe sanguin C bovin et recherche de gènes candidats. Mémoire de DEA, Universités de Limoges/Poitiers/Tours.

