

**ETIQUETAGE DES MICROCHROMOSOMES DU POULET
PAR DES MARQUEURS MOLECULAIRES
EN UTILISANT L'HYBRIDATION *IN SITU* EN FLUORESCENCE.**

Fillon Valérie¹, Morisson Mireille¹, Zoorob Rima², Auffray Charles², Douaire Madeleine³, Vignal Alain¹

¹Laboratoire de Génétique Cellulaire, Centre INRA de Toulouse-Auzeville, BP27, 31326 Castanet Tolosan, France, ²Génétique Moléculaire et Biologie du Développement, CNRS UPR 420, 94801 Villejuif, France, ³Laboratoire de Génétique, ENSAR, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France.

Résumé

Le caryotype du poulet comporte 78 chromosomes ($2n=78$) dont 60 microchromosomes de très petite taille, quasiment indiscernables les uns des autres et donc classés approximativement par ordre de taille décroissante. Ces microchromosomes sont typiques des génomes aviaires, et leur importance génétique est loin d'être négligeable. En effet, ils représentent environ un tiers du génome total, et semblent contenir une très grande proportion de gènes. Pour les identifier et attribuer ainsi à chaque paire un contenu génétique (groupe de liaison), nous avons choisi de les étiqueter à l'aide de sondes moléculaires par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Ces marqueurs sont alors visualisés simultanément sur les chromosomes. A ce jour, 15 paires ont été étiquetées ; des groupes de liaison pourront ainsi être attribués à des microchromosomes clairement identifiés et permettre d'accéder à de nouvelles connaissances concernant les gènes portés par cette partie du génome.

Abstract

**Labelling of chicken microchromosomes by molecular markers
using two-color fluorescent *in situ* hybridization (FISH)**

The chicken karyotype is constituted of 78 chromosomes ($2n=78$) including 30 pairs of indistinguishable microchromosomes usually ordered arbitrarily by decreasing size. Microchromosomes are typical of avian genomes. They represent one third of the chicken genome and seem to carry a high gene density. In order to distinguish each microchromosome and to facilitate linkage group assignments, we realized two-color fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments using simultaneously different probes. Presently, 15 different microchromosome pairs have been individualized. This will enable the assignment of linkage groups to the microchromosomes, and thus contribute to the assessment of the gene content for this part of the genome.

Introduction

Le caryotype du poulet comporte 78 chromosomes ($2n=78$) répartis en 9 paires de macrochromosomes (dont les gonosomes ZZ pour les mâles ou ZW pour les femelles) comparables en taille à des chromosomes de mammifères, et en 30 paires de microchromosomes (figure 1). Ces derniers sont de très petite taille et quasiment indiscernables les uns des autres lorsque l'on établit le caryotype : ils sont simplement classés approximativement par ordre de taille décroissante. La standardisation du caryotype de la poule n'a donc pas pu être précisée au delà de la huitième paire d'autosomes (Ladjali et al., 1993). Les

microchromosomes sont typiques des génomes d'oiseaux, et leur importance génétique est loin d'être négligeable (Rodionov, 1996, pour revue). En effet, ils représentent environ un tiers du génome total (Tegelström et Rytman, 1981), et semblent contenir une grande densité de gènes puisque les îlots CpG y sont concentrés (Mac Queen et al., 1996). A ce jour, plusieurs gènes y ont été localisés (Ponce de Leon et Burt, 1993), mais seule une estimation de la taille des microchromosomes concernés a pu être donnée. Par ailleurs, d'autres études ont montré l'existence d'un chiasma par microchromosome au moment de la méiose (Rahn et Solari, 1986; Rodionov et al., 1992). Il y aurait donc au moins une recombinaison par microchromosome et leur taille génétique serait donc

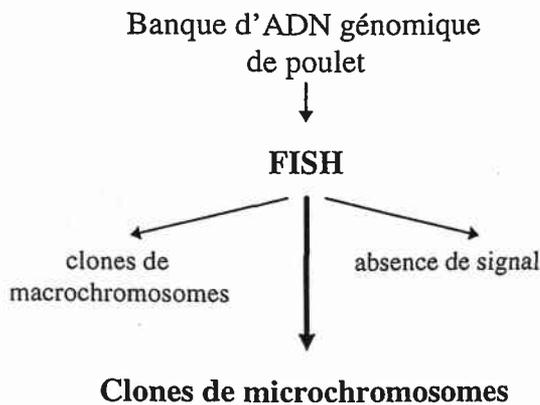
considérable par rapport à leur taille physique. Pour améliorer la connaissance du génome de la poule, des cartes géniques sont actuellement en cours de développement (Burt et al., 1995; Vignal, 1997).

Un problème majeur de la réalisation des cartes est qu'il est pour l'instant très difficile d'attribuer à chaque paire de microchromosomes un contenu génétique (groupe de liaison) puisqu'il est impossible de les identifier. Nous avons donc choisi d'étiqueter ces microchromosomes à l'aide de marqueurs moléculaires. En effet, la technique de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet de les visualiser sous forme de signaux fluorescents directement sur les chromosomes métaphasiques observés au microscope photonique.

Stratégie

Nous avons d'abord sélectionné des sondes hybridant sur des microchromosomes à partir de clones issus de banques d'ADN génomique de poulet à grandes insertions (figure 2).

FIGURE 2 : schéma rappelant le protocole de sélection des marqueurs de microchromosomes.



Comme il aurait été fastidieux d'hybrider les sondes sélectionnées deux à deux dans toutes les combinaisons possibles, la taille approximative de chacun des microchromosomes marqués a été estimée et des groupes de deux ou trois sondes concernant des chromosomes de taille voisine ont été constitués. Après avoir vérifié que les sondes de chaque groupe étaient différentes, nous avons réalisé des hybridations des groupes pris deux à deux, chacun étant révélé par un fluorochrome de couleur différente (figure 3).

FIGURE 1 : photographie d'une métaphase de poulet (mâle), $2n=78$ dont 60 microchromosomes punctiformes.

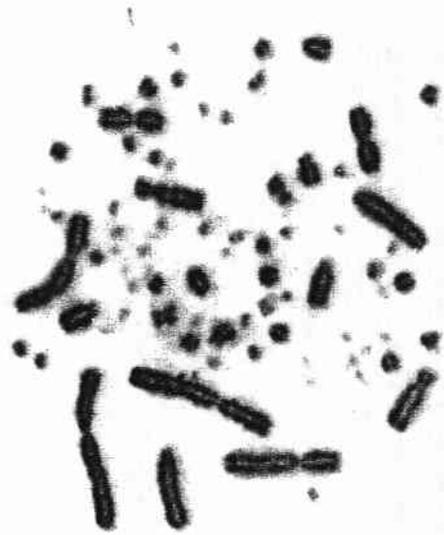
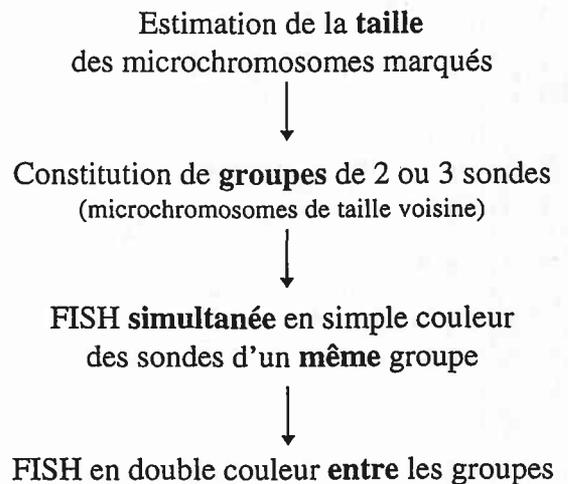


FIGURE 3 : schématisation du protocole de l'utilisation des groupes de sondes.



Lorsqu'un microchromosome a été étiqueté par deux marqueurs et donc deux couleurs, les sondes des groupes concernés ont été hybridées deux à deux pour déterminer celles qui identifiaient le même chromosome. Chaque marqueur moléculaire a ainsi été affecté à une paire de microchromosomes.

Matériel et méthodes

Préparations chromosomiques

Les chromosomes sont obtenus à partir de cultures cellulaires de fibroblastes d'embryon de poulet synchronisés par 0,8 mg/mL de thymidine (Sigma) puis bloqués en métaphase par 0,06 µg/mL de colcémide (Gibco). Le choc hypotonique est réalisé classiquement avec du sérum de veau fœtal dilué (1:5), puis les cellules métaphasiques sont fixées par un mélange d'éthanol et d'acide acétique (3:1) et étalées sur des lames porte-objet.

Clones

Les clones testés proviennent de banques d'ADN génomiques à grandes insertions, réalisées dans des vecteurs de type BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ou PAC (P1-derived Artificial Chromosome). Ils ont été choisis au hasard ou après le criblage préalable pour la présence d'un microsatellite (CA)_n.

FISH en simple couleur

Selon la technique décrite par Yerle et al. (1992), 100 ng d'ADN sont marqués à la biotine par incorporation de biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim). Après une hybridation de 24 heures, les sondes sont révélées en vert par de l'avidine-fluoresceine isothiocyanate (FITC, Vector) et les chromosomes sont colorés en rouge par de l'iodure de propidium (Sigma) ajouté au milieu de montage (Vectashield, Vector).

FISH en double couleur

Pour distinguer chaque microchromosome, des sondes différentes sont hybridées simultanément. Deux groupes de 2 ou 3 sondes sont marqués par l'incorporation de digoxigénine (digoxigenin-11-dUTP, Boehringer Mannheim) ou de biotine (biotine-16-dUTP, Boehringer Mannheim). Les sondes marquées sont ensuite resuspendues ensemble et hybridées 24 heures avec la préparation chromosomique. Les sondes marquées à la biotine sont ensuite révélées en rouge avec de l'avidine-Texas red (Vector), alors que celles ayant incorporé de la digoxigénine sont détectées par du FITC de

couleur verte (Boehringer Mannheim). Les chromosomes sont colorés en bleu par du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole-dihydrochloride, Sigma) ajouté au milieu de montage (Vectashield, Vector).

Observation des lames

Les lames sont observées avec un microscope Zeiss (objectif à immersion, grossissement 100) et un minimum de 20 métaphases sont analysées pour chaque expérience. Les chromosomes qui présentent des signaux d'hybridation sont photographiés avec un film couleur 400 ASA Ektachrome.

Résultats

1. Repérage des sondes de microchromosomes

Des clones issus de différentes banques d'ADN génomique de poulet ont été hybridés afin de repérer les sondes concernant des microchromosomes. Ainsi, à partir de 29 BAC et de 32 PAC, nous avons sélectionné 12 marqueurs de microchromosomes présentant une intensité de signal suffisante et donc pouvant servir de sondes de référence. Nous avons également rajouté deux gènes et un cosmide à ce panel pour disposer finalement de 15 marqueurs (tableau 1). Il est à noter qu'un des clones BAC a donné des signaux d'intensités différentes, donc discernables, sur deux paires de microchromosomes.

TABLEAU 1 : liste des marqueurs utilisés pour constituer le panel d'identification de microchromosomes.

Clones PAC	6
Clones BAC	6
Clones cosmidiqes	1
Cosmide du gène de la synthétase des acide gras (Le Fur et al., 1996)	1
Cosmide du gène du complexe majeur d'histocompatibilité (Guillemot et al., 1988)	1
Total	15

2. Etiquetage des microchromosomes

Les 15 sondes ont été réparties en 6 groupes de 2 ou 3 clones identifiant des microchromosomes différents. Après une série de 15 hybridations en double couleur de ces groupes pris deux à deux dans toutes les combinaisons possibles, deux clones se sont localisés sur le même microchromosome. Ils ont pu être identifiés après les hybridations successives des sondes des deux groupes concernés. Le nombre de sondes-étiquettes de microchromosomes a donc été ramené à 14. Sachant par ailleurs qu'un des clones permet d'identifier deux paires de microchromosomes, un total de 15 paires différentes a donc ainsi été étiqueté par ces 14 marqueurs.

Conclusion

Grâce à cette collection de sondes, la moitié des microchromosomes sont aujourd'hui identifiables. D'autres clones seront progressivement rajoutés afin de compléter l'étiquetage de ces petits chromosomes. Mais, au fur et à mesure de la progression du travail, il sera de plus en plus difficile de marquer une nouvelle paire.

Par ailleurs, des marqueurs génétiques dérivés des sondes utilisées sont en cours de développement et vont permettre de compléter les données de cartographie génétique. De nouveaux groupes de liaison pourront ainsi être attribués à des microchromosomes clairement identifiés. Dans l'avenir, il deviendra ainsi possible d'évaluer la taille génétique des microchromosomes et leur taux de recombinaison et d'accéder à de nouvelles connaissances concernant les gènes qu'ils portent.

Références

- Burt D.W., Bumstead N., Bitgood J.J., Ponce de Leon F.A., Crittenden L.B., 1995. *Trends Genet.*, 5, 190-194
- Guillemot F., Billault A., Pourquoié O., Béhar G., Chaussé A.-M., Zoorob R., Kreibich G., Auffray C., 1988. *EMBO J.*, 7, 2775-2785.
- Ladjali K., Bitgood J.J., Shoffner R.N., Ponce De Leon F.A., 1993. 8th North American Colloquium on Domestic Animals Cytogenetics, (Guelph, Ontario, Canada).
- Le Fur N., El Khadir-Mounier C., Powel R.S., Diot C., Mallard J. Douaire M., 1996. *Eur. J. Biochem.*, 240, 323-330.

- Mac Queen H., Fantes J., Cross S.H., Clark V.H., Archibald A.L., Bird A.P., 1996. *Nat. Genet.*, 12, 321-324.
- Ponce de Leon F.A., Burt D., 1993. *Manipulation of the Avian Genome*, septembre 93, 14-20.
- Rahn M.I., Solari A.J., 1986. *Cytogenet. Cell Genet.*, 43, 187-193.
- Rodionov A.V., Myakoshina Y.U.A., Chelysheva L.A., Solovei I.V., Gaginskaya E.P., 1992. *Genetika*, 28, 53-63.
- Rodionov A.V., 1996. *Russian J. Genet.*, 32 (5), 517-527.
- Tegelström H., Rytman H., 1981. *Hereditas*, 94, 225-233.
- Trask B.J., Massa H., Kenwrick S., Gitschier J., 1991. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 1-15.
- Vignal A., 1997. 2^{èmes} journées de la Recherche Avicole, Tours, 8-10 avril.
- Yerle M., Galman O., Lahbib-Mansais Y., Gellin J., 1992. *Cytogenet. Cell Genet.*, 59, 48-51.