

LOCALISATION DU GÈNE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS DE LA POULE DANS UNE RÉGION DU GÉNOME CONSERVÉE ENTRE UN MICROCHROMOSOME AVIAIRE ET LE CHROMOSOME 17q HUMAIN.

Pitel Frédérique¹, Fillon Valérie¹, Le Fur Nathalie², Vignal Alain¹

¹ Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA, Castanet-Tolosan, France, ² Laboratoire de Génétique, INRA-ENSAR, Rennes, France,

Résumé

La synthétase des acides gras (*FAS*) est une enzyme-clé de la lipogénèse et joue probablement un rôle crucial dans la variabilité du poids de tissu adipeux abdominal du poulet de chair. Nous avons localisé ce gène sur un microchromosome de poulet par hybridation *in situ* en fluorescence. Un polymorphisme a été mis en évidence dans différentes lignées de poulet après amplification d'un fragment du gène *FAS* (de 626 paires de bases), digestion par l'enzyme *RsaI* et analyse de conformation en simple brin. Les deux familles de référence internationales pour la cartographie génique du poulet se sont révélées informatives pour ce polymorphisme, et le gène *FAS* a été localisé sur les groupes de liaison E31 (carte américaine) et C25 (carte anglaise). Le groupe C25 contient également, à 3,6 cM du gène *FAS*, le gène *NDPK* (Nucleoside Diphospho-Kinase) localisé sur le chromosome humain 17 (dans la région q2.1), sur lequel est également localisé le gène *FAS* (q2.5). Nous avons donc ici conservation de synténie entre un microchromosome de poule et un chromosome humain.

Abstract

Localization of the avian fatty acid synthase gene to a conserved region between a chicken microchromosome and human chromosome 17q.

The fatty acid synthase (*FAS*) is a key enzyme of lipogenesis, and may play a crucial role in the weight variability of abdominal adipose tissue in the growing chicken. We have localised this gene on a microchromosome by FISH, using a cosmid probe containing a genomic fragment of the avian *FAS* gene. A 626 bp long fragment was amplified by PCR, and showed polymorphism in different avian lines after digestion with *RsaI* and Single Strand Conformation Analysis. Both the East Lansing and Compton reference families were informative with this SSCP and the *FAS* gene was assigned to linkage groups E31 and C25 respectively on the East Lansing and Compton maps. These groups were already associated through marker COM93. The C25 linkage group contains also the *NDPK* gene (3.6 cM to *FAS*), located on human chromosome 17q2.1. The *FAS* gene being also located to human chromosome 17, in the region q2.5, this is the first demonstration of synteny conservation between an avian microchromosome and a human chromosome.

Introduction

La synthétase des acides gras, ou *FAS* pour "Fatty Acid Synthase", est une enzyme majeure impliquée dans la biosynthèse des acides gras à longue chaîne à partir de l'Acétyl Coenzyme A. Elle convertit l'Acétyl-CoA et le Malonyl-CoA en palmitate. Ce gène joue par conséquent un rôle primordial dans le métabolisme du gras. En particulier, la variabilité de poids du tissu adipeux abdominal chez le poulet en croissance peut être en partie contrôlée par ce gène (Douaire *et al.*, 1992). Comme la quantité de gras est d'une importance économique non négligeable dans les lignées de poulet de chair, une connaissance précise des gènes impliqués dans l'expression de ce caractère quantitatif pourrait être utile dans les programmes de sélection.

Notre objectif dans cette étude était de localiser le gène *FAS* sur la carte génique du poulet, ce qui constitue un pas important vers l'analyse génétique de l'implication de ce gène dans le caractère "quantité de gras" qui nous intéresse.

Nous disposons des séquences des ADNc codant pour le gène *FAS* publiées chez le rat (Amy *et al.*, 1992), la souris (Paulauskis et Sul, 1989), l'oie (Kameda et Goodridge, 1991) et le poulet (Huang *et al.*, 1994).

Matériel et méthodes

Localisation génétique

Les réactions PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été effectuées à l'aide de deux oligonucléotides

choisis à partir de la séquence du gène *FAS* de poulet disponible dans la banque de données EMBL sous le numéro d'accès J03860, dans la région 3' non codante: FASU: 5'-TCAGAAAGGGTGGAAAGTGAG-3', FASL: 5'-AGGTCTCCTCTGTATCATAG-3'.

La température d'hybridation pour ce couple est de 57°C. Le mélange réactionnel contenait 20 ng d'ADN génomique, 200 µM de chaque dNTP, 1 µM de chacune des deux amorces, 1,5 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl et une unité de *Taq* polymérase (Gibco BRL). Le fragment amplifié (de 626 paires de bases) a été digéré par 5 U de *RsaI*, et analysé après dénaturation sur un gel non dénaturant (Acrylamide/Bisacrylamide (49/1) + Glycérol 5%) pour visualiser un polymorphisme de conformation en simple brin (SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism, Beier, 1993) après coloration à l'argent (Budowle *et al.*, 1991).

Un polymorphisme a été observé dans chacune des deux familles de référence (Compton, U. K., et East Lansing, U. S. A.) utilisées pour construire la carte génétique du poulet (Bumstead et Palyga, 1992 ; Crittenden *et al.*, 1993).

Localisation cytogénétique

Les métaphases ont été obtenues à partir de cultures de fibroblastes d'embryons ayant subi une double synchronisation à la thymidine (0,8 mg/ml, Sigma). Les cultures ont été arrêtées par 0,06 mg/ml de colcémide (Gibco), et fixées par les procédures habituelles (éthanol/acide acétique 3:1). Suivant les méthodes décrites par Yerle *et al.* (1992), cent nanogrammes du cosmide Fc16 (Le Fur *et al.*, 1996) ont été marqués à la biotine par random priming (incorporation de biotin-16-dUTP, Boehringer Mannheim). La sonde a été hybridée *in situ* pendant 24 heures en présence de 40 µg d'ADN de poulet soniqué et détecté par FITC (avidin-fluorescein isothiocyanate, Vector). Les chromosomes ont été contre-colorés par de l'iodure de propidium (Sigma) ajouté au milieu de montage (Vector).

L'analyse des lames a été réalisée avec un microscope (Zeiss) en fluorescence, et 43 métaphases ont été observées. Les métaphases portant un signal fluorescent ont été photographiées sur un film couleur Ektachrome ASA 400.

Résultats et discussion

Localisation génétique

Un fragment du gène *FAS* de 227 paires de bases, obtenu après digestion par *RsaI* du fragment de 626 paires de bases amplifié par PCR, a montré un polymorphisme de conformation en simple brin dans les deux familles de référence. Deux allèles ont été observés, et le parent F1 était hétérozygote dans les deux cas. Ce polymorphisme dans la partie 3'-non codante du gène de la synthétase des acides gras du poulet nous a permis de localiser ce gène sur le groupe de liaison C25 de la famille de référence anglaise (Compton), et sur le groupe de liaison E31 chez la famille américaine (East Lansing) (Fig. 1). Nous savions déjà que ces deux groupes de liaison étaient équivalents, puisqu'ils contenaient tous les deux le marqueur COM93.

Une donnée intéressante réside dans le fait que le gène *FAS* est lié, sur la carte anglaise, au gène NDPK (Nucleoside Di-Phosphate Kinase). Ces deux gènes sont localisés sur la carte humaine sur le bras q du chromosome 17 (Jayakumar *et al.*, 1994. Backer *et al.*, 1993).

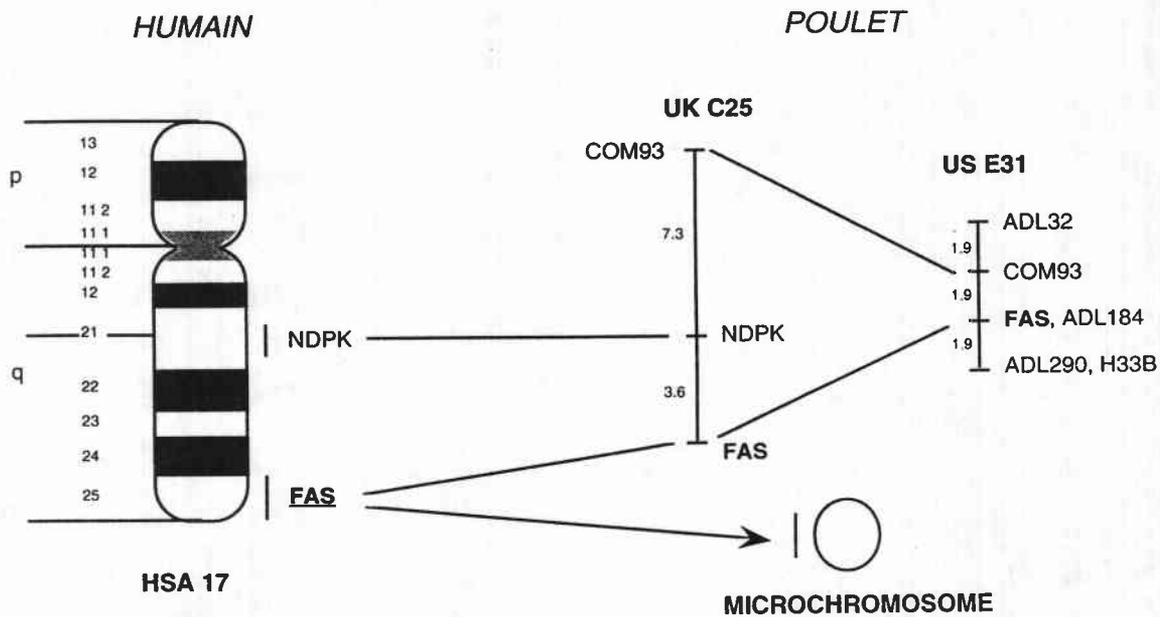
Localisation cytogénétique

Parmi les métaphases observées, 32 (74%) montraient un signal fluorescent sur une paire de microchromosomes.

Comme nous avons assigné le gène *FAS* du poulet sur un microchromosome par hybridation *in situ*, et qu'il est génétiquement lié, chez la poule, à un gène également situé sur le chromosome 17q humain, nous pouvons supposer qu'une région du chromosome 17q humain est conservée sur un microchromosome aviaire.

Le chromosome 17 humain est en grande partie conservé sur le chromosome 11 de la souris (HGM, 1993) et est homologue au chromosome 12 porcine (Goureau *et al.*, 1996). Une conservation de synténie a également été observée entre des portions du chromosome 17 humain et le chromosome 10 chez le rat, 19 chez les bovins et 11 chez le mouton (HGM, 1993). La conservation de groupes de synténie a déjà été observée entre le poulet et d'autres espèces (revue par Burt *et al.*, 1995), mais ces régions conservées sont en majorité localisées sur des macrochromosomes, ces derniers étant les plus souvent étudiés. Ce résultat permet d'espérer que la cartographie comparée entre le poulet et les espèces les mieux cartographiées actuellement pourra être développée avec succès, même dans des régions génomiques restreintes comme les microchromosomes.

FIGURE 1 : Localisation du gène *FAS* chez le poulet. Comparaison avec la carte humaine



Conclusion

Outre cet intérêt en cartographie comparée, les résultats apportés par ces travaux permettent de faire avancer l'intégration des cartes génétique et cytogénétique du poulet, qui est un des objectifs importants de la cartographie du génome aviaire à l'heure actuelle (Vignal, 1997).

D'autre part, l'étude du polymorphisme du gène *FAS* pourrait prochainement être effectuée dans des croisements appropriés à la détection de QTL (comme un croisement entre une lignée grasse et une lignée maigre par exemple). La mise en évidence d'un tel polymorphisme pourra nous permettre, dans l'avenir, de déterminer s'il existe une liaison entre ce gène et une région du génome impliquée dans la quantité de gras. Même si ce gène n'intervient pas dans le phénotype observé, une analyse génétique peut permettre d'exclure la portion du génome entourant ce gène en tant que région intéressante pour le caractère, le gène intervenant alors comme simple marqueur génétique.

Remerciements

Nous remercions L.B. Crittenden, H. Cheng et N. Bumstead pour nous avoir fourni les échantillons d'ADN des familles de référence internationales, et Madeleine Douaire pour nous avoir donné le cosmide Fc16.

Références

Amy C.M., Williams-Ahlf B., Naggert J., Smith S., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1105-1108.
 Backer J.M., Mendola C.E., Kovesdi I., Fairhurst J.L., O'Hara B., Iddy R.L., Shows T.B., Mathew S.

Murty V.S., Chaganti R.S., 1993. Oncogene. 8. 497-502.
 Beier D.R., 1993. Mamm. Genome .4. 627-631.
 Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allens R.C., 1991. Am. J. Hum. Genet.. 48. 137-144.
 Bumstead N. et Palyga J. 1992. Genomics 13. 690-697.
 Burt N., Bumstead N., Bitgood J., Ponce De Leon F.A., Crittenden L.B., 1995. Trends Genet., 11. 190-194.
 Crittenden L.B., Provencher L., Santangelo I., Levin I., Abplanalp H., Briles R.W., Briles W.E. Dodgson J.B. 1993. Poult. Sci., 72. 334-348
 Douaire M., Le Fur N., El Khadir-Mounier C., Langlois P., Flamant F. Mallard J., 1992. Poult. Sci.. 71, 1911-1920.
 Goureau A., Yerle M., Schmitz A., Riquet J., Milan D., Pinton P., Frelat G., Gellin J., 1996. Genomics. 36, 252-262.
 Huang W-Y., Chirala S.S., Wakil S.J., 1994. Arch. Biochem. Biophys., 314, 45-49.
 Jayakumar A., Chirala S.S., Chinault A.C., Baldini A., Abu-Elheiga L., Wakil S.J., 1994. Genomics, 23, 420-424.
 Kameda K. et Goodridge A.G., 1991. J. Biol. Chem., 266, 419-426.
 Le Fur N., El Khadir-Mounier C., Powell R.S., Diot C., Mallard J., Douaire M., 1996. Eur. J. Biochem., 240, 323-330.
 Paulauskis J.D. et Sul H.S., 1989. Biochem. Biophys. Res. Commun., 158, 680-695.
 Vignal A., 1997. Deuxièmes journées de la Recherche Avicole, Tours, 8-10 Avril 1997.
 Yerle M., Galman O., Lahbib-Mansais Y., Gellin J., 1992. Cytogenet. Cell Genet., 59, 48-51.