

Analyse moléculaire du locus *Callipyge*

S. BERGHMANS (1), T.L. SHAY (2), G. RETTENBERGER (3), R. FRIES (4), M. GEORGES (1), N. E. COCKETT (2)

(1) Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Génétique,
Boulevard de Colonster (B43/3), Sart-Tilman, B-4000 Liège, BELGIQUE

(2) Utah State University, College of Agriculture, Department of Animal Dairy and Veterinary Sciences,
Logan, Utah, 84322-4815, ETATS-UNIS

(3) Institut für Nutztierwissenschaften, Gruppe Züchtungsbiologie,
Tannenstr. 1 (TAN D), ETH Zentrum, 8092 Zürich, SUISSE

(4) Technische Universität München (TUM), D-85350 Freising-Weihenstephan, ALLEMAGNE

RÉSUMÉ – Une mutation provoquant une hypertrophie musculaire a été mise en évidence chez le mouton. Le locus *callipyge* responsable a été localisé sur le chromosome 18 par étude de liaison génétique. Cette mutation représentant un avantage pour l'élevage ovin, une étude de caractérisation du fonctionnement et du mode d'action du gène a débuté. Celle-ci implique l'isolation du locus par la construction d'un contig de chromosomes artificiels de levures (YAC, Yeast artificial chromosome) couvrant l'espace compris entre les deux marqueurs génétiques flanquant le locus *callipyge* et le contenant. Afin d'avancer plus rapidement vers une région plus limitée comprenant le gène, un raccourci utilisant la méthode de FISH (Fluorescent *in-situ* hybridization) suivi d'une microdissection d'ADN est développé. La FISH a maintenant été réalisée à partir des premiers chromosomes artificiels de levures isolés et la microdissection est en cours.

Molecular analysis of the *Callipyge* locus

S. BERGHMANS (1), T.L. SHAY, G. RETTENBERGER, R. FRIES, M. GEORGES, N. E. COCKETT

(1) Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Génétique,
Boulevard de Colonster (B43/3), Sart-Tilman, B-4000 Liège, BELGIUM

SUMMARY – A mutation causing muscular hypertrophy has been identified in the sheep. The causative *callipyge* locus was mapped by a linkage study to chromosome 18. This mutation represents an obvious advantage for sheep-breeding. Therefore a study to establish the identity of the gene has started. This study implies the isolation of the locus by building a contig of YAC (Yeast artificial chromosome) clones spanning between the DNA markers flanking the *callipyge* locus and including it. As a short-cut to search for a more limited region containing the gene, a method including FISH (Fluorescent *in-situ* hybridization) followed by microdissection of DNA has been proposed. The FISH step has now been successfully accomplished using the first YACs isolated. The microdissection is in progress.

INTRODUCTION

Une mutation provoquant une hypertrophie musculaire associée à une plus grande maigreur de viande et une meilleure efficacité alimentaire a été identifiée chez le mouton (Cockett et al., 1994). Cette hypertrophie se remarque surtout au niveau de la ceinture pelvienne et le phénotype n'apparaît que trois semaines après l'agnelage. Les agneaux hypermusclés montrent une augmentation de 32 % de la masse musculaire par rapport aux agneaux normaux (Jackson & Green, 1993). Le nom de *callipyge* et le symbole CLPG ont été proposés pour le gène responsable et l'existence de deux allèles (CLPG et clpg) fut suggérée ; les animaux CLPG/clpg présentant l'hypertrophie musculaire et les clpg/clpg étant de conformation classique (Cockett et al., 1994).

Ce phénotype représente un intérêt économique indéniable pour l'industrie du mouton. Dans ce cadre, il est clair que l'identification du gène et la compréhension de son fonctionnement sont des étapes importantes pour son utilisation en élevage. Le premier stade de cette étude fut la localisation du gène *callipyge* dans le génome ovin et ceci par étude de liaison génétique (Ott, 1991). Il existait à l'époque très peu de marqueurs génétiques chez le mouton, au contraire du bovin, mais la conservation de séquences et de la localisation des marqueurs entre ovins et bovins nous a permis d'exploiter des marqueurs bovins chez le mouton. Les pedigrees disponibles étaient constitués de deux familles de demi-frères/soeurs paternels ségrégeant pour le phénotype *callipyge* (béliers CLPG/clpg x brebis clpg/clpg). Nous avons montré une liaison entre le locus *callipyge* et GMBT16, un VNTR (Variable number of tandem repeats) bovin localisé précédemment au niveau de la région télomérique du chromosome 21 bovin et de son homologue 18 ovin. L'utilisation de marqueurs supplémentaires du chromosome 21 bovin a permis la construction d'une carte chromosomique du chromosome 18 ovin. Cette carte localise le locus CLPG entre deux microsatellites, CSSM18 et TGLA122, respectivement à 3 centimorgans (cM) et 17.5 cM (Cockett et al., 1994). Remarquons que la région intéressée chez le bovin est l'extrémité télomérique du chromosome 21.

Notre projet en collaboration avec Utah State U., s'inscrit dans la continuité de la compréhension du gène *callipyge* : l'étape suivante étant le clonage positionnel du gène, la région voisine du gène doit être isolée. Pour ce faire, une stratégie de «chromosome walking» (Bentley, 1992) à partir du marqueur génétique le plus proche (CSSM18) semble la plus indiquée. Une des méthodes les plus efficaces pour avancer à travers un chromosome est d'utiliser une banque à larges inserts d'ADN comme le proposent les banques génomiques de chromosomes artificiels de levures (Yeast Artificial Chromosome, YAC) (Hiether et al., 1990).

Dans notre cas, cette évolution le long du chromosome 21 bovin à l'aide d'une banque bovine de chromosomes artificiels de levures pourraient s'avérer longue vu la distance qui sépare les deux marqueurs génétiques flanquant le gène *callipyge*. Pour ce faire, une méthode alternative, court-circuitant un chromosome walking trop long, est choisie. Les clones de la banque de YAC isolés grâce au microsatellite CSSM18 sont utilisés pour réaliser une hybridation *in-situ* par fluorescence (Fluorescent *in-situ* hybridation, FISH) (Lawrence, 1990). Une fois localisée, la région d'intérêt peut être microdissectée avec précision. On a alors une portion du chromosome, limitée à la région d'intérêt, dans laquelle nous pouvons trouver de nouvelles séquences spécifiques ou STS (Sequence tagged site). Selon des estimations actuelles, la microdissection nous fournira une partie du chromosome équivalente à 10% de sa taille. Ceci représente 10 cM ou 10 millions de paires de bases (pb). Si l'on isole 50 nouveaux STS, cela en placera en moyenne un tous les 200.000 pb. Or comme la taille moyenne d'un clone de la banque de YAC est de 650.000 pb, le criblage de la banque avec les nouveaux STS devrait permettre la cristallisation d'un contig (collection de clones chevauchants) de la région.

En dehors de cette approche conventionnelle visant à cloner le gène *callipyge*, l'aspect ségrégationnel doit être investigué pour permettre l'utilisation efficace du gène dans l'élevage (Cockett et Georges, non publié). En effet, des études préliminaires plaident en faveur d'un mode de ségrégation non-mendélien. Dans l'état actuel d'avancement, l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer les phénomènes d'héritabilité semble être l'imprinting parental (Efstratiadis, 1994).

En dehors de cette approche conventionnelle visant à cloner le gène *callipyge*, l'aspect ségrégationnel doit être investigué pour permettre l'utilisation efficace du gène dans l'élevage (Cockett et Georges, non publié). En effet, des études préliminaires plaident en faveur d'un mode de ségrégation non-mendélien. Dans l'état actuel d'avancement, l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer les phénomènes d'héritabilité semble être l'imprinting parental (Efstratiadis, 1994).

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. CRIBLAGE DE LA BANQUE GÉNOMIQUE DE CHROMOSOMES ARTIFICIELS DE LEVURE ET CARACTÉRISATION DES CHROMOSOMES ARTIFICIELS DE LEVURE

La banque génomique bovine en chromosomes artificiels de levure de Libert et al. (1993) a été criblée par PCR (Polymerase Chain Reaction) au moyen du microsatellite CSSM18 (Barendse et al., 1994) comme décrit précédemment (Libert et al., 1993). La taille des YAC est déterminée par électrophorèse en champs pulsé suivie de transfert selon Southern et hybridation à une sonde composée d'ADN génomique bovin total comme décrit précédemment (Libert et al., 1993).

Les extrémités des YAC sont ensuite isolées par la méthode dite de «bubble-PCR» ou «vectorette-PCR» (Riley et al., 1990) et séquencées par cycle sequencing (Kit Cyclist, Stratagene).

1.2. PURIFICATION DE L'ADN DE YAC ET FISH (FLUORESCENT IN-SITU HYBRIDIZATION)

L'ADN des chromosomes artificiels est purifié par électrophorèse en champs pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), traitement à l'agarase, extraction (deux phénol-chloroforme suivis d'un chloroforme) et précipitation à l'éthanol 100%. Une fois purifié l'ADN, l'hybridation *in-situ* est effectuée comme décrit précédemment (Toldo et al., 1993).

2. RÉSULTATS

2.1. CRIBLAGE DE LA BANQUE

Un premier criblage de la banque génomique bovine de chromosomes artificiels de levures avec le microsatellite CSSM18 a permis d'identifier neuf clones positifs. Quatre de ces neuf clones furent retenus après un second criblage sur de l'ADN purifié des clones individuels. Il y sera fait référence dans la suite comme les YAC 1, 5, 6 et 8.

2.2. CARACTÉRISATION DES CHROMOSOMES ARTIFICIELS DE LEVURE

Suite à la caractérisation de ces YAC faite par PFGE et Southern Blot, il en ressort que la taille de ces inserts d'ADN bovin varie : pour les YAC 1 et 5, la taille est de 1000 kilobases (kb) ; de 450 kb pour le YAC 6 et de 360 kb pour le YAC 8.

Les extrémités gauche et droite de ces YAC sont ensuite caractérisées par Bubble-PCR. Seules six des huit extrémités ont été isolées par cette méthode puis séquencées par cycle sequencing, les extrémités droites du YAC 1 et du YAC 6 n'ont pu être isolées. Pour chacune des six séquences, un STS spécifique est développé. Seuls cinq STS spécifiques sont synthétisés : nous les appelons 1L, 5L, 5R, 6L, 8L, 8R (le chiffre indique le YAC d'origine du STS et L/R indiquent respectivement s'il s'agit de l'extrémité gauche ou droite de ce YAC). Ces STS devaient permettre de : 1. déterminer si les YAC isolés étaient chimériques et 2. placer ces clones les uns par rapport aux autres pour former un contig. Les contrôles préliminaires de ces STS sur de l'ADN génomique bovin par PCR semblant concluants, nous avons testé ceux-ci par PCR sur des hybrides somatiques afin de vérifier la présence de chimérisme. Malheureusement l'ensemble des hybrides somatiques s'est montré positif alors qu'un seul devait l'être. Une hypothèse pouvait expliquer cette situation, les STS choisis se trouvaient dans de l'ADN hautement répétitif du génome bovin. Ceci expliquerait pourquoi les tests sur ADN génomique fonctionnent mais aussi pourquoi les hybrides somatiques sont tous positifs.

Nous avons vérifié cette hypothèse en criblant des banques de données (EMBL et Genbank) avec un outil BLAST de recherche d'homologie pour mettre en évidence un rapport entre les séquences des extrémités de YAC et des séquences répétitives du génome bovin. Il en ressort que certaines de nos séquences d'extrémités avaient une très haute homologie avec différentes familles de séquences bovines de type Alu. L'extrémité 1L se localise dans des SINE (Short Interspersed Nuclear Element) décrits par Lenstra (Lenstra et al., 1993) : BTBOV1, BTBOV1D et BTBOV2 (N° EMBL : X64124, X64126, X64125). Les extrémités 5R, 6L et 8L se retrouvent elles dans une famille de SINE décrite par Szemraj (Szemraj et al., 1995) : BTREVTRNA et BTRPTDNA (N° EMBL : Z25525, Z25531).

2.3. FISH

Pour l'hybridation in-situ par fluorescence (FISH), les YAC 6 et 8 sont choisis pour être purifiés après isolement par PFGE. L'ADN obtenu pour chacun de ces YAC est alors

utilisé pour réaliser l'hybridation. Le YAC 6 s'est hybridé comme espéré avec le chromosome bovin 21 dans la région 21q23-q24. La méthode FISH nous a en plus fourni l'information que le YAC 6 n'était pas chimérique.

3. DISCUSSION

L'isolement de quatre clones positifs dans la banque de chromosomes artificiels de levures à partir du criblage avec CSSM18 confirme la complexité de la banque développée par Libert et al. estimée à approximativement 5-6 équivalents génome.

Vu les problèmes liés à la présence de SINE au niveau des extrémités de YAC, nous n'avons pu pour l'instant caractériser complètement les clones isolés. Nous n'avons donc pas encore d'évaluation quant à la présence ou non de chimérisme dans les clones isolés. Les résultats obtenus par la technique de FISH nous a néanmoins fourni de l'information pour ce qui est du YAC 6. Celui-ci ne semble pas être chimérique.

La localisation en 21q23-q24 par FISH à partir de ce YAC nous permet de confirmer l'exactitude des résultats obtenus par étude de liaison génétique et d'aller plus en avant dans cette région du chromosome 21 bovin. Remarquons aussi que cette localisation du YAC 6 met en évidence une expansion de la carte génétique à cet endroit ainsi qu'il a déjà été montré précédemment par d'autres expériences. En effet si l'on s'en tient à la carte génétique, il existerait entre les deux marqueurs CSSM18 et GMBT16 17% de recombinaison. Or GMBT16 étant cartographié à l'extrémité télomérique du chromosome 21, CSSM18 devrait se trouver bien plus à l'intérieur du chromosome puisqu'on estime que celui-ci a une taille totale d'environ 120 cM. Par contre la localisation du YAC 6 positif à CSSM18, place celui-ci à l'extrémité télomérique du chromosome 21, très proche physiquement de GMBT16. Ceci plaide donc en faveur de la présence télomérique d'une région à plus forte proportion de recombinaison, expliquant ainsi la différence entre la cartographie physique et la cartographie par étude de liaison génétique.

Les résultats obtenus par FISH vont nous permettre de réaliser un contig de la région à partir de l'isolement d'une cinquantaine de nouveaux STS. Une fois le contig construit, nous irons plus en avant dans la caractérisation et la compréhension du mode de fonctionnement et d'action du gène *callipyge*.

Berghmans S. bénéficie d'une bourse de spécialisation du Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA).

RÉFÉRENCES

- BARENDSE W., ARMITAGE S.M., KOSAREK L.M., SHALOM A., KIRKPATRICK B.W., RYAN A.M., CLAYTON D., LI L., NEIBERGS H.L., ZHANG N., GROSSE W.M., WEISS J., CREIGHTON P., MCCARTHY F., RON M., TEALE A.J., FRIES R., MCGRAW R.A., MOORE S.S., GEORGES M., SOLLER M., WOMACK J.E., HETZEL D.J.S., 1994, *Nature Genetics*, 6, 227-235.
- BENTLEY D.R., In *Techniques for the Analysis of Complex Genomes* (Anand R.), The analysis of YAC clones. 111-135.
- COCKETT N.E., JACKSON S.P., SHAY T.L., NIELSEN D., STEELE M.R., GREEN R.D., GEORGES M., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3019-3023.
- EFSTRATIADIS A., 1994, *Current Opinion in Genetics and Development*, 4, 265-280.
- GREEN E.D., OLSON M.V., 1990, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 1213-1217.
- HIETHER P., CONNELLY C., SHERO J., MCCORMICK M.K., ANTONARAKIS S., PAVAN W., REEVES R., 1990. In *Genome Analysis Vol. 1* (Davies K.E. & Tilghman S.M.), Yeast artificial chromosomes : promises kept and pending. 83-120.
- JACKSON S.P., GREEN R.D., 1993, *Proc., Western Sect. Amer. Soc. Anim. Sci.*, 44, 364-366.
- LAWRENCE J.B., 1990. In *Genome Analysis Vol. 1*. (Davies K.E. & Tilghman S.M.), A fluorescence in situ hybridization approach for gene mapping and the study of nuclear organization. 1-38.
- LENSTRA J.A., VAN BOXTEL J.A.F., ZWAAGSTRA K.A., SCHWERIN M., 1993, *Animal Genetics*, 24, 33-39.
- LIBERT F., LEFORT A., OKIMOTO R., GEORGES M., 1993, *Genomics*, 18, 270-276.
- OTT J., 1991. In *Analysis of human genetic linkage* (The Johns Hopkins University Press).
- RILEY J., BUTLER R., OGILVIE D., FINNIEAR R., JENNER D., POWELL S., ANAD R., SMITH J.S., MARKHAM A.F., 1990, *Nucleic Acid Res.*, 18, 2887-2890.
- SZEMRAJ J., PLUCIENNICZAK G., JAWORSKI J., PLUCIENNICZAK A., 1995, *Gene*, 152, 261-264.
- TOLDO S.S., FRIES R., STEFFEN P., NEIBERGS H.L., BARENDSE W., WOMACK J.E., HETZEL D.J.S., STRANZINGER G., 1993, *Mammalian Genome*, 4, 720-727.