

TYPAGE MOLECULAIRE DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE CHEZ LE POULET : VERS UNE MEILLEURE CARACTERISATION DES GENOTYPES

**Chazara Olympe, Pinard-van der Laan Marie Hélène, Tixier-Boichard Michèle,
Bed'Hom Bertrand**

INRA / AgroParisTech, UMR1236 Génétique et Diversité Animales 78350 Jouy en Josas

RÉSUMÉ

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est une région génomique complexe des Vertébrés, encore imparfaitement connue chez le poulet et qui présente une très grande variabilité génétique. Le CMH joue un rôle central dans l'organisation de la réponse immunitaire d'un animal aux pathologies infectieuses : il comprend notamment les gènes codant pour les protéines qui présentent les antigènes aux lymphocytes.

Traditionnellement la caractérisation du CMH chez le Poulet s'effectue par sérologie et n'est possible que pour des génotypes déjà connus. Le but de cette étude est de pouvoir proposer un typage moléculaire du CMH pour tout type de Poulet, y compris les races locales, en utilisant un marqueur appelé LEI0258, combiné à des marqueurs SNPs.

Le marqueur LEI0258 a donc été précisément caractérisé et des séquences cibles de la région B du MHC ont été déterminées pour en dériver des SNPs. La corrélation entre ce typage moléculaire et la classification sérologique traditionnelle a été établie dans des lignées expérimentales White Leghorn. Le panel de marqueurs a été étudié sur un large panel de races expérimentales, commerciales et locales.

La validation de marqueurs permettant le typage moléculaire du CMH chez le Poulet autorise l'exploration de la diversité génétique de cette région dans de nouvelles lignées et races. Cela participe au développement de stratégies alternatives et intégrées de lutte contre des pathologies majeures de l'élevage aviaire.

ABSTRACT

The major histocompatibility complex (MHC) is a complex genomic region in Vertebrates, still imperfectly known in the chicken and which shows a great genetic variability. The MHC plays a central role in the immune response of an animal to infectious diseases: it contains the genes coding for proteins that present antigens to the lymphocytes.

Characterization of MHC in the chicken is classically performed by serology and tests are available only for already known genotypes. The purpose of this study is to develop a molecular MHC genotyping for any type of chicken, including local breeds, using a marker called LEI0258 combined with SNP markers.

The marker LEI0258 was precisely characterized and SNP markers have been obtained by resequencing specific targets in MHC B region. Correlation between molecular typing and traditional serological classification has been established in experimental lines of White Leghorn. The markers panel has then been studied in a wide range of experimental, commercial and local breeds.

Validation of markers for molecular genotyping of the Chicken MHC will permit the exploration of the genetic diversity of this region in new lines and breeds. This work contributes to the development of alternative strategies and global fight against major diseases in poultry breeding.

INTRODUCTION

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est une région génomique complexe des Vertébrés, encore imparfaitement connue chez le Poulet (Kaufman *et al.*, 1999) et qui présente à certains loci une très grande variabilité génétique. Le CMH joue un rôle central dans l'organisation de la réponse immune d'un animal aux pathologies infectieuses. Une meilleure connaissance du déterminisme génétique de la réponse immunitaire contre les agents pathogènes est un atout important pour développer une stratégie globale de lutte contre les maladies infectieuses (Pinard-van der Laan, 2002). Les outils de la génomique, notamment le grand nombre de marqueurs génétiques de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) issus de la séquence du génome, renouvellent les possibilités de caractérisation du CMH du poulet. Ce projet contribue donc à l'amélioration des connaissances sur le système immunitaire du poulet.

En premier lieu, la corrélation entre le typage sérologique traditionnel du CMH, par hémagglutination, et le typage moléculaire, établie sur des populations de référence par Fulton *et al.* (2006), a été examinée dans des lignées expérimentales INRA. Le typage moléculaire présenté vise à caractériser la région B du CMH du Poulet, génétiquement indépendante de la région Y. C'est la région B qui a été essentiellement impliquée dans des phénomènes de résistance/susceptibilité aux maladies infectieuses chez le Poulet.

L'architecture génétique de la région B du CMH a ensuite pu être explorée dans différents types de populations de poulets pour lesquelles de l'ADN est disponible, en l'absence de sérologie. Il s'agit en particulier de races locales, qui peuvent présenter des caractères intéressants d'adaptation au milieu, mais pour lesquelles le recueil de données expérimentales est très difficile.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Les lignées Réponse Immune (R.I.), White Leghorn, de l'UMR GDA, Jouy-en-Josas, INRA, maintenues à Nouzilly, INRA, ont été sélectionnées depuis 13 générations sur des critères relatifs à la réponse immunitaire : lignée 1, réponse anticorps après vaccination contre le virus de la maladie de Newcastle; lignée 2, hypersensibilité retardée en réponse à la phytohémagglutinine; lignée 3, clairance du carbone comme indicateur de la phagocytose ; lignée 4, lignée témoin (Minozzi *et al.*, 2008).

Un référentiel de 48 populations a été défini pour l'exploration du CMH. Il inclut 6 lignées commerciales (4 lignées poulets de chair et 2 lignées pondeuses œufs bruns), 17 populations White Leghorn (issues de 15 lignées expérimentales dont les

lignées R.I. et d'une lignée commerciale pondeuse) et 25 autres races dont 12 races européennes, 7 races locales asiatiques et 6 populations locales africaines. Chaque population est représentée par 2 animaux, un mâle et une femelle quand cette information était disponible.

1.2. Marqueurs moléculaires

Les fondateurs des lignées R.I. ont été typés en sérologie. La sérologie par hémagglutination caractérise les protéines exprimées à la surface des cellules sanguines, essentiellement les gènes BG (sans équivalent chez les Mammifères) ainsi que les gènes BF (gènes de classe I).

Ces animaux ont ensuite été génotypés avec le marqueur LEI0258 comme décrit par Fulton *et al.* (2006), afin de déterminer la corrélation entre ce marqueur et la sérologie dans ces lignées.

Le marqueur LEI0258 est un marqueur de type Variable Number of Tandem Repeat, complexe, composé principalement de deux motifs répétés consécutifs de 12 et 13 pb

Les 96 animaux du panel défini pour l'exploration du CMH ont été également génotypés avec le marqueur LEI0258 sur séquenceur automatique.

1.3. Régions séquencées

Des régions conservées le long de la séquence du CMH ont été identifiées afin de concevoir des amorces permettant d'amplifier 19 fragments correspondant à 10 gènes cibles (Figure 1) : CD1A1, TAP2, TAP1, BMB1, BMB2, BMA, Tapasin, Blec1, B-BTN2, TRIM27.1, chez les 96 animaux issus du panel préalablement défini.

Les gènes étudiés ont été choisis en partie grâce aux données déjà disponibles sur leur polymorphisme (Shiina *et al.*, 2007) mais également en fonction de la faisabilité technique.

Les 19 fragments, de 306 pb à 1179 pb, ont été séquencés au Centre National de Séquençage (CNS).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les tailles d'allèles observées pour le marqueur LEI0258 chez les animaux fondateurs des lignées R.I. ont été comparées à la sérologie déjà établie pour ces animaux (B15, B19, B21, B34 et B124). Une forte corrélation a été mise en évidence entre les types de CMH déterminés par les deux techniques et un tableau de correspondance a pu être établi (Tableau 1).

Les tailles d'allèles du marqueur LEI0258, observées pour les animaux du panel, sont présentées au Tableau 2. Les allèles identifiés, d'une taille allant de 183 à 541 paires de bases (pb), peuvent être classés dans 24 catégories. Grâce aux données de la littérature (Fulton *et al.*, 2006) et aux corrélations établies dans les lignées R.I., il est possible, dans la plupart des cas, de

proposer une correspondance avec un ou plusieurs haplotype B du CMH (défini en sérologie) à partir de l'information donnée par la taille d'allèle du marqueur LEI0258. On remarque l'importante diversité présente en Afrique et en Asie dans les populations locales ainsi que dans les races européennes, en comparaison avec la diversité observée dans les lignées White Leghorn : 10 catégories d'allèles pour 17 populations étudiées. Ce résultat s'explique notamment par la présence de lignées expérimentales congéniques dans le panel de populations White Leghorn. On remarque cependant que ces lignées montrent la plus grande amplitude de taille d'allèle (183 à 541 pb).

Le séquençage des 19 fragments, représentant 10 gènes, CD1A1, TAP2, TAP1, BMB1, BMB2, BMA, Tapasin, Blecl1, B-BTN2, TRIM27.1, a permis d'explorer la variabilité génomique d'un total de 15128 paires de bases réparties sur une région de 147500 pb (Tableau 3).

De nombreuses différences d'organisation génomique ont été observées, des insertions, délétions et SNPs. Au total, 517 SNPs ont été caractérisés, ce qui correspond à un taux de polymorphisme de 3,42 % (3,42 SNPs pour 100 pb). Mais la distribution des SNPs n'est pas uniforme, certains gènes présentent un plus fort pourcentage, en particulier le gène TAP1 (5,52%, Tableau 4). Ce gène est un gène de classe I non-classique qui code pour une protéine intervenant au niveau du chargement des peptides antigéniques par les molécules de classe I, qui a pour conséquence la présentation de ces peptides aux lymphocytes T à la surface de la cellule.

Une partie des régions codantes de ces 10 gènes a donc été séquencée permettant à l'identification de 225 SNPs. Ces SNPs peuvent alors être répartis entre SNPs synonymes (changement d'acide nucléique sans conséquence sur la séquence d'acides aminés de la protéine) ou non-synonymes.

Certains gènes présentent un grand nombre relatif de SNPs non-synonymes, par exemple Blecl1 (Tableau 4). La fonction du gène Blecl1 n'a pas encore été caractérisée mais il code pour une protéine appartenant à la famille des lectines de type C. D'autres gènes, comme BMB1, présentent relativement peu de mutations non-synonymes

(Tableau 4). BMB1 est un gène de classe II non-classique. Chez les Mammifères, les molécules codées par ces gènes interviennent au niveau du chargement des peptides antigéniques par les molécules de classe II.

Ces résultats ont pu être comparés aux résultats publiés par Shiina *et al* (2007). Dans cette étude, les auteurs ont séquencé la région du CMH d'un animal d'une lignée expérimentale Red Jungle Fowl et l'ont comparé à la séquence connue du génome. Grâce au grand nombre de séquences analysées et à la diversité des populations choisies pour notre panel, nous avons pu mettre en évidence 1,5 fois plus de SNPs (Tableau 3). Nous avons également pu mettre en évidence 2 fois plus de SNPs dans des régions codantes (225 vs 111). Mais, proportionnellement, le nombre de SNPs synonymes vs non-synonymes est globalement cohérent entre les deux études (139 et 86 vs 71 et 40, respectivement).

CONCLUSION

Cette étude présente les résultats préliminaires obtenus lors du séquençage d'un nombre important de portions de gènes de la région B du CMH du Poulet dans un large panel de populations d'origines très variées. De nombreux nouveaux SNPs ont été identifiés et en parallèle les 96 animaux du panel de populations choisies pour l'étude ont été typés au niveau du CMH grâce au marqueur moléculaire LEI0258. Les informations de SNP et du marqueur LEI0258 étant maintenant disponibles pour chacun des 96 animaux du panel, leur corrélation le long de la séquence et donc la reconstruction d'haplotypes va permettre de mieux comprendre la structure de la région et déterminer comment le typage avec le marqueur LEI0258 doit être complété afin de mieux caractériser la région B du CMH chez les animaux. Cette étude permettra également de rappeler l'importante diversité génétique présente dans les races locales et la ressource potentielle que représentent ces races locales, étudiées ici pour un complexe de gènes impliqués dans des mécanismes de résistance à des maladies infectieuses chez le Poulet, dont les conséquences économiques ne sont plus à démontrer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fulton, J.E., Juul-Madsen, H.R., Ashwell, C.M., McCarron, A.M., Arthur, J.A., O'Sullivan, N.P., et al., 2006. *Immunogenetics*, 58, 407-421.
- Kaufman, J., Milne, S., Gobel, T.W., Walker, B.A., Jacob, J.P., Auffray, C., Zoorob, R., Beck, S., 1999. *Nature*, 28, 923-925.
- Minozzi, G., Parmentier, H.K., Mignon-Grasteau, S., Nieuwland, M.G., Bed'hom, B., Gourichon, D., Minvielle, F., Pinard-van der Laan, M-H., 2008. *BMC Genet.* 14, 9-5.
- Pinard-van der Laan, M-H., 2002. *Vet Immunol Immunopathol.*, 87, 199-205.
- Shiina, T., Briles, W.E., Goto, R.M., Hosomichi, K., Yanagiya, K., Shimizu, S., et al., 2007. *J. Immunol.*, 178, 7162-7172.

Tableau 1. Correspondance entre le typage du CMH en sérologie et le typage moléculaire du CMH, en taille d'allèle du marqueur LEI0258 (en paires de bases) chez les animaux issus des lignées R. I.

Sérologie	LEI0258
B15	261
B21	359
B34	422
B124	489
B19	544

Tableau 2. Tailles d'allèles identifiées pour le marqueur LEI0258 et correspondance hypothétique avec un ou plusieurs haplotypes B du CMH définis par Fulton *et al.*, pour chacune des catégories de populations étudiées par séquençage.

Taille allèle LEI0258* (pb)	Haplotype B du CMH (Fulton <i>et al.</i> 2006)	Poules locales Afrique	Races locales Asie	Lignées poulets de chair	Races Europe	Pond. œufs bruns	Lignées White Leghorn
Nombre de populations étudiées :		6	7	4	12	2	17
183	B4						X
193-194	B15.1, B11, B61, B27, BW3	X		X	X		
205-206	B13.2, B17, BW11	X	X	X	X		X
217				X	X		
235		X					
247-249	B18, B15.2, B22, B73	X	X	X	X		X
260-261	B15, B2, B29	X		X	X		X
273-274			X	X			
295-296	B5, B11.1,	X	X	X	X		
307-308	B72, B78	X			X	X	X
309-310	B10, B24, B26, B76		X			X	X
311		X			X		
319-320		X	X				
321-322	B74	X					
334	BW4	X					
346	B14		X		X		
356-359	B5.1, B6.1, B21, B75, B130, B131, B201, B1.1, B75, B23, B77	X	X	X	X		X
369	B21.1, BQ, BW1	X		X			
380-382	B13.1	X	X	X	X		
422	B34, B62						X
443	B6		X				
485-488	B12, B12.1, B124		X				X
526					X		
538-541	B19						X

* les tailles d'allèles ont été regroupées en catégories car la technique de typage utilisée à une limite de résolution d'environ 2 pb

Tableau 3. Bilan total des SNPs identifiés pour les 10 gènes étudiés et comparaison avec les résultats obtenus par Shiina *et al.* en 2007 lors du séquençage de la région complète chez un animal Red Jungle Fowl.

nb pb analysées	nb SNPs	% SNPs	nb pb analysées Shiina <i>et al.</i>	nb SNPs Shiina <i>et al.</i>	% SNPs Shiina <i>et al.</i>	nb SNPs s.	nb SNPs n.s.	nb SNPs s. Shiina <i>et al.</i>	nb SNPs n.s. Shiina <i>et al.</i>
15128	517	3.42%	29219	315	1.08%	139	86	71	40

nb, nombre ; pb, paires de bases ; s., synonymes ; n.s., non-synonymes

Tableau 4. Bilan des SNPs identifiés par séquençage pour trois gènes : Blec1, BMB1 et TAP1.

Gène	nb fragments	nb pb analysées	nb seq analysées	nb SNPs	% SNPs	nb SNPs ds codant	nb SNPs s.	Nb SNPs non s.	ratio s/n.s
Blec1	2	2197	315	78	3.55%	10	5	5	1.00
BMB1	2	1190	320	39	3.28%	26	20	6	3.33
TAP1	2	852	369	47	5.52%	12	8	4	2.00

nb, nombre ; pb, paires de bases ; seq, séquences ; s., synonymes ; n.s., non-synonymes

Figure 1. Structure du CMH chez le Poulet et localisation du marqueur LEI0258 et des fragments séquencés (échelle en paire de bases, d'après Shiina *et al.*, 2007).

