

AFFICHE/POSTER

Utilisation de la technique des minisatellites hypervariables chez *Barbus barbuis* (*Osteichthyes, Cyprinidae*)¹

par M. CASTELLI², J. C. PHILIPPART², G. VASSART¹ et M. GEORGES¹

DNA fingerprint in *Barbus barbuis* (*Osteichthyes, Cyprinidae*)

Plusieurs milliers de segments d'ADN appelés minisatellites sont dispersés dans le génome des eucaryotes supérieurs. Ils sont caractérisés par de courtes répétitions en « tandem ». Le polymorphisme des minisatellites est basé sur la variation du nombre de répétitions. Des « empreintes » (ou « code à barres ») génétiques individuelles ont été mises en évidence chez le barbeau commun (*Barbus barbuis*) (CASTELLI *et al.*, 1990). Les bandes de chaque descendant (n = 32) peuvent être retracées chez au moins un des deux parents, prouvant ainsi la stabilité somatique et germinale des séquences minisatellites. En groupant les résultats obtenus avec trois enzymes de restriction (Hinf I, Hae III, Mbo I), nous avons distingué, en moyenne, 8, 18,5, 23 et 22,5 bandes par individu, pour les sondes M13, pUCJ, α -globine et Per respectivement. L'analyse de la ségrégation des minisatellites montre que les parents sont hétérozygotes pour 77 % de ceux-ci. Assumant que cette hétérozygotie correspond à $2q(1-q)/(2q(1-q)+q^2) = (2-2q)/(2-q)$, la fréquence allélique moyenne, q, des allèles étudiés est égale à 0,37. Le taux de ségrégation de 72 bandes (34 maternelles et 38 paternelles) présentes à l'état hétérozygote dans le « code à barres » d'un des deux parents a montré que seules cinq de ces bandes dévient significativement (P < 0,5) de la valeur attendue 16:16. Ce résultat attesterait d'une ségrégation non mendélienne de certains minisatellites. D'autre part, la distribution de la fréquence des taux de ségrégation observés n'est pas significativement différente de la distribution binomiale attendue, confirmant la ségrégation mendélienne de la plupart des bandes. L'analyse de liaison génétique effectuée sur 123 marqueurs minisatellites mis en évidence chez 32 descendants diploïdes témoins et 16 descendants diploïdes gynogénétiques montre que 68 de ces marqueurs ségrègent de façon indépendante, les 55 autres bandes étant groupées en 11 clusters. Différentes régions du génome peuvent donc être explorées à l'aide des séquences minisatellites et une même région du génome peut être caractérisée par plusieurs marqueurs. Ces différents résultats prouvent que la technique des minisatellites hypervariables peut être utilisée dans différents domaines de la biologie des poissons requérant l'usage de systèmes génétiques hautement polymorphes, notamment en génétique ainsi qu'en écologie et en éthologie.

Nous avons utilisé les minisatellites pour vérifier l'absence de contribution paternelle et estimer l'hétérozygotie résiduelle chez des barbeaux gynogénétiques de première génération. Le pourcentage moyen Y (*) de descendants hétérozygotes pour 68 loci à l'état hétérozygote chez la mère est de 47 %. Pour 6 de ces loci, l'hétérozygotie est de 100 %, ce qui suggère le phénomène d'interférence lors de la méiose pour certains chromosomes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez la truite arc-en-ciel (ALLENDRORF *et al.*, 1986) ; ainsi, même chez le barbeau, la gynogenèse par rétention du second globule polaire ne peut constituer une méthode utile à la production de lignées pures homozygotes.

D'autre part, nous avons utilisé les minisatellites pour mettre en évidence des marqueurs de gènes récessifs létaux en comparant la ségrégation des minisatellites dans des

¹ Manuscrit reçu le 5 juillet 1993 ; accepté le 8 juillet 1993.

² Laboratoire de Démographie des Poissons et d'Aquaculture, Service d'Éthologie, Faculté des Sciences, Université de Liège, Chemin de la Justice, 10, 4500 TIHANGE, Belgique.

³ Institut de Recherche Interdisciplinaire et Unité de génétique clinique et moléculaire, Hôpital Erasme, Faculté de Médecine, Université libre de Bruxelles, route de Lennik, 808, 1070 BRUXELLES, Belgique.

⁴ Genmark Inc., Wakara Way, 417, SALT LAKE CITY, Utah 84108, USA.

* $Y = \frac{\Sigma (n1-n2)}{N}$ n1 = fréquence des descendants porteurs du marqueur étudié
n2 = fréquence des descendants non porteurs du marqueur
N = nombre total descendants

descendances gynogénétique et triploïde. La diminution de survie observée chez les barbeaux gynogénétiques (35,5 %) par rapport aux barbeaux diploïdes témoins (75,3 %) et triploïdes (71,1 %) pourrait être due à une déficience en l'un des deux génotypes homozygotes attendus chez les barbeaux gynogénétiques, liée à l'existence de gènes récessifs létaux. Pour cette étude, nous avons utilisé 8 sondes (pUCJ, α -globine, Per, M13, Insuline, p33F1, C, EFD) et deux enzymes de restriction (Hinf I, Hae III). La ségrégation de 40 bandes présentes à l'état hétérozygote dans le « code à barres » du géniteur femelle a été analysée chez 60 de ses descendants gynogénétiques et 60 de ses descendants triploïdes. Cette analyse montre que 17 bandes ségrègent de façon mendélienne. Le taux de ségrégation de 17 autres bandes dévie significativement de la valeur attendue 30:30 dans les deux descendances, suggérant ainsi un « crossing-over » entre ces marqueurs et leur centromère. Les six dernières bandes montrent une déviation de la valeur attendue 30:30 dans une des deux descendances. En assumant une létalité zygotique liée à un seul gène et une dominance du gène sauvage, nous avons établi différents modèles pour lesquels il est possible de détecter un lien entre un allèle récessif léthal et un marqueur minisatellite. Tous les cas de figures possibles ont été envisagés :

- (1) lorsque le géniteur femelle seul est porteur de l'allèle récessif léthal ou les deux géniteurs sont porteurs de cet allèle,
- (2) lorsque le marqueur et l'allèle récessif léthal sont sur un seul chromosome ou sur deux différents chromosomes de la même paire,
- (3) lorsqu'un ou deux « crossing-over » se produisent entre le marqueur et l'allèle récessif léthal.

Dans les deux modèles retenus, le géniteur mâle est de type sauvage et aucun « crossing-over » n'a lieu entre le marqueur étudié A et l'allèle récessif léthal I. Seule la position du marqueur A par rapport à l'allèle récessif léthal I est différente. Toutefois, un même gène peut être retracé dans ces deux modèles. Dans le premier cas (marqueur A et allèle I sur le même chromosome), quand la probabilité de crossing-over est nulle, aucune descendant gynogénétique porteur du marqueur A n'est produit. Quand la probabilité de « crossing-over » est de 1, 100 % de descendants A sont obtenus. Dans les mêmes conditions, le pourcentage de descendants triploïdes porteurs du marqueur A varie de 50 à 100 %. Dans le deuxième cas (marqueur A et allèle I sur deux chromosomes), le pourcentage de descendants gynogénétiques A est invariablement de 100 %, alors que le pourcentage de descendants triploïdes A varie de 50 à 100 %. En comparant les taux de ségrégation théoriques calculés pour chaque modèle en fonction de la probabilité de « crossing-over » et les taux de ségrégation observés, nous avons détecté 6 bandes, entre 2,6 kb et 7,6 kb, candidats au marquage de gènes récessifs létaux. Une étude de liaison génétique est prévue pour déterminer la distance entre ces bandes ; une liaison entre ces marqueurs renforcerait l'hypothèse de létalité récessive. De plus, le clonage de ces marqueurs informatifs pourrait être envisagé ; l'utilisation de sondes « locus-spécifique » chez des barbeaux gynogénétiques et triploïdes à un stade précoce du développement embryonnaire et au stade alevin devrait définitivement confirmer l'hypothèse de gènes récessifs létaux responsables de la mortalité différentielle précoce des barbeaux gynogénétiques. Toutefois, suite à plusieurs travaux récents sur l'« imprinting » (chez la souris notamment), nous ne pouvons écarter l'hypothèse de l'existence chez les poissons de tels gènes qui seraient responsables de la viabilité réduite des individus gynogénétiques. Enfin, chez la truite arc-en-ciel, aucune survie différentielle d'un des deux gynogénotypes homozygotes n'a été observée par ALLENDORF *et al.* (1986). Ils expliquent ce résultat par l'existence de gènes dupliqués dont l'expression procurerait un locus alternatif, du moins en partie, à la fonction physiologique du locus défectueux. Le barbeau, comme la truite, est, en terme d'évolution, une espèce tétraploïde. Mais, contrairement à la truite, le barbeau semblerait être une espèce diploïde fonctionnelle, comme le suggère nos résultats en plus des études enzymatiques menées par des groupes scientifiques français (Montpellier) et tchèque (Libechov) et de l'observation de l'absence de tétravalents lors de la méiose (CASTELLI, non publié).

BIBLIOGRAPHIE

- ALLENDORF F. W., SEEB J. E., KNUDSEN K. L., THORGAARD G. H. et LEARY R. F. (1986). — Genecentromere mapping of 25 loci in rainbow trout. *J. Hered.*, **77** : 307-312.
- CASTELLI M., PHILIPPART J. C., VASSART G. et GEORGES M. (1990). — DNA fingerprint in fish. A new generation of genetic markers. *American Fisheries Society Symposium*, **7** : 514-520.