

POLYMORPHISMES BIOCHIMIQUES CHEZ LA POULE DOMESTIQUE

II. — CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU POLYMORPHISME DE LA TRANSFERRINE

G. CROIZIER

avec la collaboration technique de J.-P. HARSCOAT

*Station de Recherches avicoles,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas*

SOMMAIRE

Les allèles (Tf^A, Tf^B, Tf^C) du locus de structure autosomal Tf sont responsables de la biosynthèse des différents types de la transferrine du sérum, de la transferrine de l'albumen (ou conalbumine) et de la transferrine du vitellus. Les trois allèles identifiés appartiennent à la même série. La sélection naturelle défavorise l'allèle Tf^C. Nous indiquons, en outre, un procédé de détection rapide des variants de la transferrine de l'albumen de l'œuf de poule : examen des gels d'amidon une heure après le début de la dispersion électrophorétique.

INTRODUCTION

Pour expliquer les polymorphismes de la transferrine sérique observés par électrophorèse chez diverses espèces animales, de nombreux auteurs postulent l'existence d'une série allélique de gènes de structure. Les résultats des tests d'allélisme sont plus rarement communiqués.

OGDEN *et al.* (1962) décrivent un polymorphisme d'origine génétique, commun à la transferrine sérique et à la transferrine de l'albumen (ou conalbumine), chez la poule. Ces auteurs attribuent le contrôle de ce polymorphisme à deux allèles codominants Tf^A et Tf^B. L'allèle Tf^A correspond à une transferrine dont la mobilité électrophorétique est supérieure à celle de la transferrine la plus répandue, contrôlée par l'allèle Tf^B.

STRATIL (1966) observe un nouveau variant génétique de transferrine à vitesse de migration électrophorétique lente. CROIZIER (1966) analyse un autre type lent de transferrine. Ces deux auteurs font l'hypothèse d'une série triallélique pour rendre compte des polymorphismes observés.

WILLIAMS (1962 *a* et *b*) montre l'identité électrophorétique et immunologique de la transferrine sérique et de la transferrine du vitellus.

Les mutations au locus Tf affectent simultanément la transferrine sérique, la transferrine du vitellus et celle de l'albumen (WILLIAMS, 1962 *a* et *b*; STRATIL, 1966; CROIZIER, 1966). STRATIL et VALENTA (1966) d'une part et BAKER (1966) d'autre part observent cette même simultanéité chez l'oie, le canard et le faisán.

Nous présentons, dans cette publication, les résultats de tests d'allélisme qui confirment l'hypothèse du contrôle génétique des variants de la transferrine de la poule par une série allélique.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Matériel animal

Les géniteurs utilisés dans les tests d'allélisme proviennent des troupeaux que nous avons décrits dans la première partie de cette étude (CROIZIER, 1966).

Méthodes

Les animaux étudiés proviennent de croisements de première génération (F_1) de croisements de seconde génération (F_2) et de croisements de retour (*Back-cross*). Le pedigree de chaque oiseau est connu.

Le génotype de chaque reproducteur est identifié par l'analyse de la transferrine sérique. Cette identification est confirmée chez les poules reproductrices par l'analyse systématique de la transferrine de l'albumen (conalbumine). L'électrophorèse du vitellus a été effectuée chez un nombre plus limité de sujets.

L'étude des croisements est réalisée en prélevant du sang soit chez les poussins d'un jour soit chez les poulets de huit semaines. Pour les premiers, le sang est prélevé à la seringue, dans la veine jugulaire, pour les seconds dans la veine alaire. L'examen de la conalbumine est effectué le plus tôt possible pour chaque poulette conservée jusqu'à l'âge de l'entrée en ponte.

Techniques d'analyse des transferrines

L'électrophorèse en gel d'amidon selon KRISTJANSSON (1963) a été utilisée selon les modalités décrites dans une autre publication (CROIZIER, 1967).

Transferrine sérique

Après séparation électrophorétique des protéines sériques, la transferrine est identifiée par autoradiographie (^{59}Fe), puis révélée sur le même gel par un colorant des protéines. La superposition des bandes de transferrine révélées par ces deux procédés localise cette protéine sur l'électrophorogramme. Par la suite, il est possible d'exploiter les électrophorogrammes sans avoir recours aux autoradiographies.

Transferrine du vitellus

L'insertion dans le gel des protéines du vitellus, présente quelques difficultés. Nous avons utilisé la technique de STRATIL et VALENTA (1966), et obtenu d'aussi bons résultats avec du papier Whatman n° 3 qu'avec le papier Whatman n° 1 utilisé par ces auteurs.

La transferrine du vitellus n'a pas été révélée par autoradiographie mais repérée sur l'électrophorogramme en juxtaposant des échantillons de vitellus et de sérum du même individu ou de sujets de même génotype.

Conalbumine

Elle a été étudiée par les mêmes techniques que la transferrine sérique. La fraction la plus abondante de cette protéine est en outre directement visible dans le gel, sans aucune révélation, grâce à la coloration saumon du complexe qu'elle forme avec le fer. La détermination du type génétique peut s'effectuer de cette manière une heure après le début de l'électrophorèse avec les variants que nous possédons.

RÉSULTATS

L'ensemble des résultats des tests d'allélisme est condensé dans le tableau 1. La partie gauche de celui-ci indique la nature du croisement et le nombre global de géniteurs participant au test. La partie droite indique la répartition des phénotypes dans les descendance de chaque type de croisement.

1° *Considérations préliminaires*

En accord avec l'hypothèse à vérifier et la nomenclature généralement admise pour la transferrine dans toutes les espèces, nous utilisons les symboles Tf^A, Tf^B, Tf^C pour les allèles et les symboles Tf. A, Tf. AB etc. pour les phénotypes.

Il existe une concordance exacte entre les variants de la transferrine étudiée dans les trois humeurs : sérum, vitellus et albumen. Le génotype d'une poule en ponte peut être obtenu par l'étude de l'une quelconque de ces humeurs.

2° *Description des phénotypes*

Transferrine sérique.

Quel que soit le phénotype Tf. A, Tf. B ou Tf. C (fig. 1) la transferrine se divise au cours de l'électrophorèse en deux fractions formant deux bandes distinctes, une bande rapide et une bande un peu plus lente quantitativement plus faible. Nous

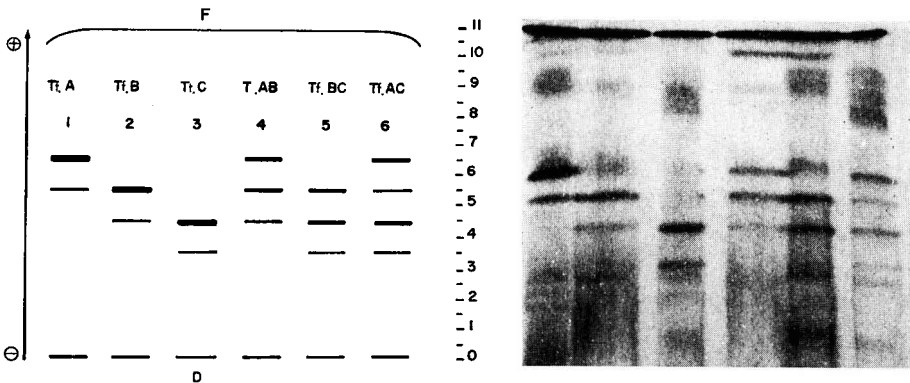


FIG. 1. — Protéinogramme des variants de la transferrine sérique

attribuons les indices 1 et 2 respectivement à la bande rapide et à la bande lente de chaque variant. Les bandes A_2 et B_1 d'une part, B_2 et C_1 , d'autre part, possèdent la même mobilité de sorte que les phénotypes Tf. AB et Tf. BC sont caractérisés par l'existence de trois bandes (fig. 1) à savoir (A_1 , $A_2 + B_1$, B_2) et (B_1 , $B_2 + C_1$, C_2). Dans le cas du phénotype Tf. AC (fig. 1) il existe quatre bandes A_1 , A_2 , C_1 et C_2 .

Ces 2, 3 ou 4 bandes s'observent sans difficulté par révélation autoradiographique. La révélation par coloration des protéines est un peu plus délicate. Les bandes A_1 et C_2 sont quelquefois masquées partiellement ou en totalité par des globulines de mobilité voisine. Cependant les bandes de transferrine sont bien délimitées et tranchent sur les globulines voisines plus hétérogènes.

Transferrine du vitellus.

La description est identique à la précédente. Le phénotype Tf. C n'a pas été étudié. Les sujets Tf^c/Tf^o proviennent de F_2 et ne sont pas en âge de pondre.

Transferrine de l'albumen : conalbumine.

Les cinq phénotypes (le phénotype Tf. C est absent pour la raison énoncée au paragraphe précédent) sont représentés dans la figure 2.

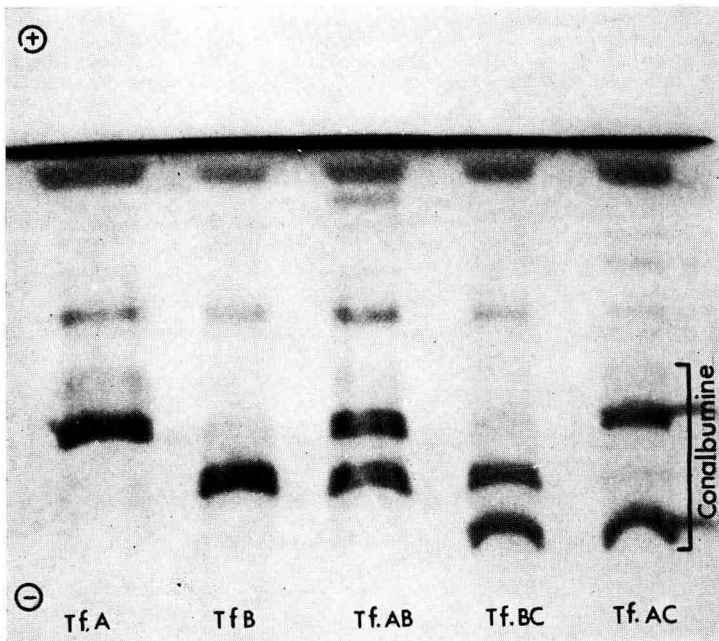


FIG. 2. — Protéinogramme des variants de la transferrine de l'albumen (conalbumine)

La conalbumine possède comme la transferrine sérique une hétérogénéité électrophorétique. Elle comporte une bande ou fraction majeure en avant de laquelle on distingue plusieurs bandes d'épaisseur moindre. La fraction majeure de la transferrine de l'albumen peut occuper trois positions dans l'électrophorogramme selon

l'allèle dont elle dérive. Ces trois positions sont visibles sur la figure 2. L'autoradiogramme (fig. 3) situe également les trois emplacements possibles pour la fraction principale de la transferrine ; ce document montre la mobilité électrophorétique des fractions mineures de cette protéine.

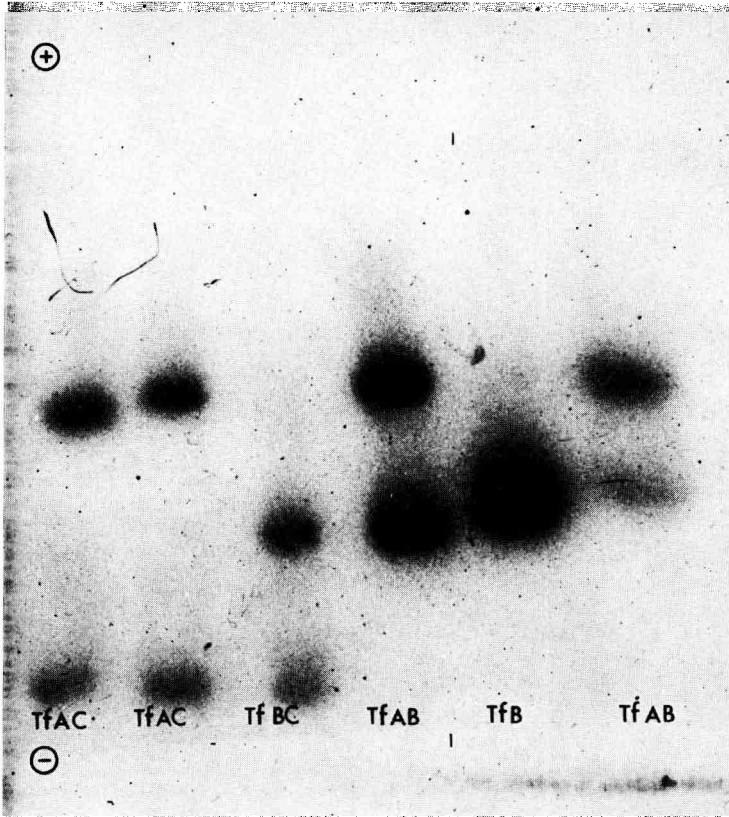


FIG. 3. — Autoradiogramme (^{59}Fe) de quelques variants de la conalbumine

3° Test d'allélisme

Les 1 339 individus issus des 13 croisements décrits dans le tableau 1 possèdent des génotypes compatibles avec l'hypothèse de la série triallélique.

La croisement 1 Tf. AB \times Tf. BC est le premier dans lequel les trois allèles sont présents. Chez les descendants, on identifie les quatre phénotypes théoriquement possibles. Les proportions observées ne diffèrent pas significativement des proportions mendéliennes.

Les croisements 2 et 3 sont des F_2 du croisement 1. Les descendants se répartissent dans les trois cases prévues du tableau 1. Les proportions génotypiques s'écartent de façon appréciable des proportions mendéliennes. On peut noter le faible nombre d'individus Tf^o/Tf^o.

Les croisements 4, 5 et 6 sont des *back-cross*. Le croisement 4 fait en particulier

TABLEAU I
Répartition globale des phénotypes de transferrine dans les tests d'allélisme

Nature des croisements		Ségrégation dans les descendants								Test de signification	
		N	Tf. A	Tf. B	Tf. C	Tf. AB	Tf. AC	Tf. BC			
Géniteurs ♂	Géniteurs ♀										
		Tf. AB	Tf. BC	Tf. AC	Tf. A	Tf. B	Tf. BC	Tf. A	Tf. B		
1	4	Tf. AB	Tf. BC	4	*	17	*	14	13	6	N. S.
2	4	Tf. BC	Tf. BC	4	*	20	6	*	*	24	0,05
3	2	Tf. AC	Tf. AC	2	3	*	2	*	8	*	*
4	1	Tf. AC	Tf. A	1	7	*	*	*	2	*	*
5	3	Tf. BC	Tf. B	3	*	16	*	*	*	20	N. S.
6	7	Tf. B	Tf. BC	7	*	53	*	*	*	60	N. S.
7	2	Tf. A	Tf. A	2	14	*	*	*	*	*	—
8	151	Tf. B	Tf. B	151	*	513	*	*	*	*	—
9	3	Tf. AB	Tf. AB	3	6	4	*	33	*	*	<0,0025
10	2	Tf. A	Tf. B	2	*	*	*	21	*	*	—
11	2	Tf. B	Tf. A	2	*	*	*	18	*	*	—
12	9	Tf. B	Tf. AB	23	*	90	*	94	*	*	N. S.
13	3	Tf. AB	Tf. B	16	*	136	*	139	*	*	N. S.

* Le faible nombre de descendants dans ces croisements rend le test de signification illusoire.

intervenir les deux mutants Tf^A et Tf^C. Pour ces trois croisements les proportions mendéliennes sont respectées.

Les croisements 7 à 13 ne font intervenir que les allèles Tf^A et Tf^B. Les résultats sont conformes à ceux attendus dans l'hypothèse de deux allèles codominants. Il convient de noter l'excès de génotype T^A/Tf^B dans le croisement 9.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Critiques des techniques et influence du fer sur la mobilité électrophorétique des transferrines

La transferrine possède la propriété fonctionnelle de fixer le fer d'une manière réversible, ce qui nous permet de la repérer par autoradiographie du ⁵⁹Fe qui lui est lié. L'étude des variants génétiques de cette protéine par ce seul procédé serait incomplète. Seuls les variants fonctionnellement actifs se révèlent lors des autoradiographies qualitatives, après dispersion électrophorétique des protéines en gel. La coloration générale des protéines représente un procédé complémentaire d'étude puisqu'il révèle tous les types de transferrine synthétisée. La comparaison des résultats de ces deux techniques de révélation permet de dresser l'inventaire des variants de transferrine que l'on peut différencier par l'électrophorèse et de préciser s'ils sont fonctionnellement actifs. L'étude présente montre que les allèles Tf^A, Tf^B et Tf^C contrôlent la synthèse de chaînes polypeptidiques fonctionnellement actives. L'emploi du ⁵⁹Fe n'a pas été systématique, mais nous avons utilisé cette technique pour analyser des sérums et des albumens contenant des transferrines de tous les génotypes connus. L'affinité plus ou moins grande des diverses variétés de transferrine pour le fer n'est pas envisagée dans cette étude. Cependant toutes les fractions de transferrine sont capables de complexer du fer ; nous n'avons pu déceler de transferrine fonctionnellement inactive.

L'hétérogénéité électrophorétique de la transferrine, commune aux variants génétiques, ne peut s'expliquer par une hétérogénéité de teneur en fer ; c'est-à-dire par la présence ou l'absence de ce métal au niveau des sites de fixation sur la protéine. Le taux de saturation en fer de la transferrine n'intervient pas ; en effet l'addition de ⁵⁹Fe ne modifie pas les mobilités électrophorétiques dans nos conditions expérimentales. Chacune des bandes du doublet de transferrine contient du fer. AASA et al. (1963) et AISEN, LEIBMAN, REICH (1966) montrent que le fer est lié à la protéine en deux sites distincts auxquels correspondent deux constantes d'association de grandeur voisine. Ces mêmes auteurs ont montré que la conalbumine présente des caractéristiques identiques. FEENEY et al. (1960) indiquent l'étroite parenté de structure des conalbumines chez les Oiseaux. La transferrine sérique de pintade se présente dans les électrophorèses sous la forme de trois bandes révélées par autoradiographie (CROIZIER, 1967). L'existence de ces trois bandes ne peut s'expliquer entièrement par des différences de saturation en fer si l'on admet que les molécules de transferrine chez cet oiseau possèdent seulement deux sites de fixation avec ce métal.

Dans le sérum humain, YOSHIOKA, FUJII, ITO (1966) ont pu cependant différencier en gel de polyacrylamide l'apo-transferrine dépourvue de fer et la transferrine qui en contient. BAKER (1966) observe également chez la poule domestique un accroissement de la mobilité électrophorétique de la conalbumine par adjonction de fer au blanc d'œuf. Utilisant une autre technique, nous n'avons pas observé de telles différences ; dans nos conditions expérimentales l'hétérogénéité électrophorétique est indépendante de la teneur en fer de la protéine.

La signification des bandes multiples contrôlées par chaque allèle de transferrine, chez diverses espèces, n'est pas connue. Les travaux de WILLIAMS (1962 *b*) suggèrent que l'hétérogénéité de la transferrine est liée à celle de la fraction glucidique de cette protéine.

Les différences de mobilité entre les variants de la transferrine doit être attribuée à la fraction polypeptidique de la molécule de transferrine puisque le doublet de bandes est affecté par la mutation. La séquence des acides aminés des différents variants n'est pas encore connue.

Critique des résultats

Les croisements Tf. A × Tf. BC ; Tf. B × Tf. AC et Tf. C × Tf. AB ainsi que les croisements réciproques n'ont pas été réalisés pour des raisons matérielles. Les autres tests d'allélisme entrepris conduisent à des résultats conformes à l'hypothèse de la série triallélique. Le génotype Tf⁰/Tf⁰ semble posséder une valeur sélective assez faible si l'on en juge par les écarts aux proportions mendéliennes observés dans les croisements 2 et 3 du tableau 1.

L'excès de Tf. AB dans le croisement Tf. AB × Tf. AB n'a pas reçu d'explication. OGDEN et al. (1962) indiquent pour ce même croisement des proportions plus voisines des proportions théoriques.

Comparaison d'allèles et nomenclature

L'identité établie entre allèles trouvés dans des populations isolées différentes conserve un caractère provisoire, en l'absence d'une vérification directe.

Plusieurs auteurs après OGDEN et al. (1962) ont rapporté l'existence d'allèle Tf^A et considéré l'allèle Tf^B comme « allèle sauvage ». STRATIL (1966) et CROIZIER (1966), le premier à partir de poules *Cornish*, le second sur des poules *Marans* trouvent un nouvel allèle qu'ils appellent Tf^C. Il semble que les expressions phénotypiques des divers allèles Tf^A, Tf^B et Tf^C soient respectivement les mêmes, ce qui justifie la nomenclature adoptée dans ce mémoire.

BAKER (communication personnelle) a observé un quatrième variant de transferrine. Il semble que celui-ci soit le plus lent de la série.

CONCLUSION

Les tests d'allélisme entrepris dans cette étude confirment le contrôle du polymorphisme de la transferrine chez la poule par une série allélique au locus Tf. Les données bibliographiques permettent actuellement de dénombrer au minimum quatre allèles connus dans cette série.

Il se confirme que le même gène permet la synthèse d'une fraction protéique commune qui entre également dans la composition de la transferrine et de la conalbumine (ovotransferrine). Les mêmes processus concernent d'autres espèces d'oiseaux : faisane, oie et canard. Chez la poule, les allèles Tf^A, Tf^B, Tf^C de la série Tf contrôlent la biosynthèse de ces deux protéines.

Reçu pour publication en mars 1967

SUMMARY

BIOCHEMICAL POLYMORPHISMS IN THE DOMESTIC FOWL

II. GENETIC CONTROL OF TRANSFERRIN POLYMORPHISM.

An investigation on the Hen's transferrins was undertaken by means of electrophoretic analysis of serum, albumen and egg yolk. These proteins were traced by ⁵⁹Fe autoradiography or amide-black colouring.

The three genetic variants previously described (CROIZIER, 1966) were studied. Figure 1 shows the different genetic variants of serum transferrin as they appear in starchgel (KRISTJANSSON's method, 1963). Figure 2 shows the variants of conalbumin. The specific binding of iron to the transferrin entitled its characterization by ⁵⁹Fe autoradiography. Figure 3 shows an autoradiogram of some genetic variants of conalbumin.

A genetic analysis showed that the transferrin variants are controlled by a number of alleles. The results of allelic tests are tabularized in table 2.

Our Tf^A and Tf^C alleles are respectively identified with the Tf^A allele described by OGDEN and al. (1962) and the Tf^C allele described by CROIZIER (1966) and STRATIL (1966). A fourth variant was discovered by BAKER (personal communication), but was not observed during our investigation.

The Tf^A, Tf^B and Tf^C alleles of the Tf structure locus are responsible for the biosynthesis of the variants of serum transferrin, conalbumin and yolk transferrin.

The variants of albumen transferrin can be quickly traced as follows : starch-gels are to be examined one hour after the beginning of electrophoretic fractionation. The main part of conalbumin appears as a pink stripe in different positions according to the variants.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AASA R., MALMSTRÖM G., SALTMAN P., VANNGÅRD T., 1963. The specific binding of iron (III) and copper (II) to transferrin and conalbumin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **75**, 203-222.
- AISEN P., LEIBMAN A., REICH H., 1966. Studies on the binding of iron to transferrin and conalbumin. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1666-1671.
- BAKER A., 1966. Molecular genetics of avian proteins. V. Egg, blood and tissue proteins of the ring-necked pheasant. *Phasianus colchicus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **17**, 467-499.
- BAKER A., 1966. Communication personnelle.
- CROIZIER G., 1966. Polymorphismes biochimiques de la Poule domestique. I. Analyse génétique des protéines du blanc d'œuf chez des poules de races françaises et étrangères. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **6**, 379-388.
- CROIZIER G., 1967. Étude de la transferrine des hybrides interspécifiques. *Gallus gallus* L. × *Numida meleagris*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, sous presse.
- FEEENEY R., ANDERSON J., AZARI P., BENNET N., RHODES M., 1960. The comparative biochemistry of avian egg white proteins. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2307-2311.
- KRISTJANSSON F., 1963. Genetic control of two pre-albumins in pigs. *Genetics*, **48**, 1059-1063.
- OGDEN A., MORTON J., GILMOUR D., McDERMID E., 1962. Inherited variants in the transferrins and conalbumins of the chicken. *Nature.*, **195**, 1026-1028.

- STRATIL A., VALENTA M., 1966. Protein polymorphism of egg white and yolk in geese and ducks. *Folia biologica* (Praha), **12**, 307-309.
- STRATIL A., 1966. A contribution towards the study of transferrins and conalbumins in the domestic fowl. In *Congrès des groupes sanguins des animaux*. Paris, sous presse.
- WILLIAMS J., 1962 a. Serum proteins and the livetins of hen's-egg yolk. *Biochem. J.*, **83**, 346-355.
- WILLIAMS J., 1962 b. A comparison of conalbumin and transferrin in the domestic fowl., *Biochem. J.* **83**, 355-364.
- WINDLE J., WIERSEMA A., CLARK J., FEENEY R., 1963. Investigation of iron and copper complexes of avian conalbumins and human transferrins by electron paramagnetic resonance. *Biochemistry.*, **2**, 1341-1345.
- YOSHIOKA R., FUJII J., ITO Y., 1966. On electrophoretic resolution and densitometric determination of apo-transferrin and iron bound transferrin. *Bioch. Bioph., Research. Comm.*, **24**, 203-207.
-