

Analyse des relations génétiques entre des races bovines françaises à l'aide de marqueurs moléculaires

*K. MOAZAMI-GOUDARZI, J-P. FURET, C. GROHS, H. LEVEZIEL, P. MARTIN
INRA, Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, 78350 Jouy-en-Josas*

Une étude préalable concernant l'analyse de la variabilité génétique de 18 races bovines françaises à partir de marqueurs biochimiques a permis de distinguer 4 sous-ensembles de races. Cette étude a été approfondie par une analyse du polymorphisme au niveau de l'ADN en utilisant les microsatellites comme marqueurs. Dix races bovines françaises choisies de façon à ce que les quatre sous-ensembles décrits soient bien représentés ont été sélectionnées. Le polymorphisme de 17 microsatellites localisés sur des chromosomes différents a été analysé sur 50 animaux non apparentés par race. Nous présentons dans cet exposé les résultats concernant ces travaux.

Analysis of the genetic variation among French cattle breeds using molecular markers

*K. MOAZAMI-GOUDARZI, J-P. FURET, C. GROHS, H. LEVEZIEL, P. MARTIN
INRA, Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, 78350 Jouy-en-Josas*

A preliminary study on the analysis of the genetic variability of 18 French cattle breeds using biochemical markers has permitted to distinguish 4 breed subsets. This study has been completed by the analysis of DNA polymorphisms using microsatellites as markers. Ten French cattle breeds representing the 4 subsets described have been chosen. The polymorphism of 17 microsatellites localised on different chromosomes has been analysed in 50 unrelated individuals per breed. In this talk, we present the results of this work.

INTRODUCTION

La modernisation de l'agriculture européenne s'est traduite dans la plupart des espèces animales domestiques par une intensification des productions, une spécialisation des troupeaux ainsi qu'une industrialisation des systèmes d'élevage. Dans ce contexte, quelques races, répondant au mieux aux enjeux économiques, se sont imposées au détriment de beaucoup d'autres dont les effectifs ont chuté. Pour faire face aux risques d'une diminution des types génétiques exploités, des programmes de conservation des ressources génétiques ont été mis en place à la fin des années soixante-dix. Ces actions de conservation sont nécessaires afin de permettre une réorientation du matériel animal en réponse aux changements et aux besoins évolutifs du marché. Ainsi, une stratégie globale de conservation des ressources génétiques est mise en oeuvre en s'appuyant sur cinq types d'actions pouvant être menées en parallèle. Il s'agit **d'identifier et d'inventorier** ces ressources (importance de la population, localisation, répartition), de les **préserver**, de **gérer** la variabilité génétique, de **connaître et évaluer** la diversité biologique des races de façon à estimer leur originalité génétique et de **valoriser** ces ressources, par exemple, par des produits d'appellation d'origine contrôlée.

Néanmoins, étant donné les contraintes économiques, il est impossible de multiplier les programmes de conservation. L'idéal serait de préserver un nombre minimum de races tout en gardant un maximum de variabilité génétique. Ceci suppose des moyens d'investigation et d'évaluation de cette variabilité plus précis permettant d'approfondir nos connaissances sur les relations entre races. Ainsi, un choix objectif des races sur lesquelles des efforts de conservation devraient porter serait facilité.

Les méthodes d'évaluation de l'originalité génétique des populations étaient jusqu'à présent fondées sur des documents historiques, des données démographiques et généalogiques, sur l'analyse zootechnique (morphologie, aptitudes), sur l'observation des caractères visibles (Lauvergne, 1989). Denis (1983), en tenant compte des opinions exprimées sur les parentés et filiations entre races dans 27 ouvrages de zootechnie parus entre 1789 et 1940, définit neuf groupes de races bovines en France. Il s'agit des groupes : Batave, Normand, Alpin, Parthenais, Breton, Jurassique, Auvergnat, Aquitain et Ibérique. Progressivement, les apports de la Génétique biochimique ont offert de nouvelles perspectives (Grosclaude, 1974), grâce à la description des polymorphismes génétiques révélés par des méthodes immunologiques (groupes sanguins) ou électrophorétiques (protéines du lait, protéines sériques ou érythrocytaires). La seule étude d'ensemble, concernant les races bovines françaises à l'aide du polymorphisme biochimique a été réalisée par Grosclaude et al (1990). Les résultats obtenus à partir de l'analyse de 13 systèmes polymorphes (11 locus 2 de groupes sanguins, la transferrine sérique et la caséine β) ont conduit à distinguer, parmi 18 races bovines françaises et la race britannique Shorthorn (cette race ayant joué un rôle important dans la création de la race Maine-Anjou) 4 sous-ensembles.

Il s'agit des groupes :

- Des races du Nord ;
- Des races du Centre et Sud-Ouest ;
- D'un ensemble de races de l'Ouest et de l'Est ;

- D'un quatrième groupe étant constitué de la seule race Normande.

Une des conclusions de cette étude était qu'une analyse plus approfondie, effectuée au moyen de systèmes génétiques polymorphes plus nombreux et bien répartis dans l'ensemble du génome, devrait permettre d'appréhender plus finement les différences entre races. En effet, l'analyse du polymorphisme protéique ne permet d'accéder (et de façon incomplète) qu'aux parties des gènes spécifiant les protéines analysées (soit moins de 5% du génome). L'analyse de l'ADN permet l'accès au polymorphisme aussi bien des séquences codantes que des séquences non codantes, soit environ trois milliards de paires de base d'ADN dans le cas des bovins et des autres mammifères. Parmi les différents marqueurs moléculaires nous avons retenu les microsatellites. Il s'agit de séquences nucléotidiques constituées de motifs répétés en tandem comprenant 1, 2 ou 3 bases, le nombre de répétitions du motif variant d'un allèle à l'autre. Ils ont été détectés dans toutes les espèces de mammifères étudiées et pour des espèces proches, il existe un certain degré de conservation. Ainsi, 40% des marqueurs isolés chez les bovins sont utilisables directement chez les caprins (Pépin et al, 1995) et ovins. On estime leur nombre à 30 000 chez les bovins et à environ 100 000 chez l'homme (Stallings et al, 1991; Steffen et al, 1993). En règle générale, les microsatellites sont assez uniformément répartis sur l'ensemble du génome (un microsatellite de type (TG) $_n$ tous les 30 Kilobases (Kb) chez l'homme et un tous les 120 à 180 Kb chez les bovins (Steffen et al, 1993 ; Vaiman et al, 1994)). De plus, ces marqueurs sont très polymorphes. En moyenne 6,4 allèles par locus sont détectés chez les bovins (Vaiman et al, 1994). Par ailleurs, l'utilisation de la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) permet une détection aisée du polymorphisme des microsatellites et autorise ainsi un typage à grande échelle des animaux. Cette technique est rapide, automatisable et nécessite peu d'ADN.

Ces diverses caractéristiques ont conduit à considérer les microsatellites comme des marqueurs de choix susceptibles de fournir une meilleure appréciation de la diversité génétique des races. Nous avons donc entrepris d'étudier le polymorphisme de 17 d'entre eux dans 10 races bovines, choisies de façon à tenir compte des différentes subdivisions définies par l'analyse des données historiques et biochimiques.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. RACES ANALYSÉES ET ÉCHANTILLONNAGE

Compte tenu de l'importance des travaux de laboratoire à réaliser, l'étude entreprise a été limitée à l'examen de 10 races bovines en tenant compte des résultats antérieurement obtenus. Huit d'entre elles ont été choisies de façon à ce que les quatre sous-ensembles distingués dans l'étude de Grosclaude et al (1990) soient représentés. Ainsi, nous avons échantillonné : la race Maine-Anjou (MA) pour le groupe des races du Nord, les races Charolaise (CH) et Limousine (LI) pour le groupe des races du Centre et du Sud Ouest, les races Bretonne Pie-Noire (BR), Parthenaise (PA), Vosgienne (VO) et Montbéliarde (MO) pour le groupe des races de l'Ouest et de l'Est et le «groupe» constitué de la race Normande (NO). A celles-ci s'ajoutent les races Holstein (HO) et Jersiaise (JE) qui représentent des témoins

internationaux. En se basant sur les données de la littérature (Nei et Roychoudhury, 1974 ; Nei, 1978), nous avons constitué, par race, un échantillon d'une cinquantaine d'animaux non-apparentés entre eux sur deux générations et ceci après examen des généalogies. Il s'agit de femelles, sauf pour la race Limousine où l'échantillon est constitué uniquement de mâles.

1.2. EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE

Pour chaque animal, l'extraction de l'ADN génomique a été effectuée selon le protocole de Jeanpierre (1987), à partir de 25 ml de sang total prélevé sur EDTA tripotassique. Les concentrations d'ADN ont été ajustées à 200 mg/ml.

1.3. MICROSATELLITES

Les microsatellites utilisés ont été choisis selon leur disponibilité parmi ceux produits au laboratoire ou dans d'autres laboratoires. Le choix a été effectué en fonction, d'une part, de leurs caractéristiques techniques (bonne aptitude à l'amplification et interprétation aisée des profils électrophorétiques) et d'autre part, de leurs caractéristiques génétiques (nombre d'allèles, localisation et répartition dans le génome). 17 marqueurs ont ainsi été retenus (Moazami-Goudarzi et al, 1994)

1.4. MÉTHODES DE DÉTECTION DU POLYMORPHISME

Les produits d'amplification obtenus après PCR ont été analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le polymorphisme a été analysé en utilisant deux modes de révélation : radioactivité et fluorescence. L'appareillage mis en oeuvre pour ces deux approches est différent. Dans le premier cas, il s'agit d'un ensemble "classique" de matériels d'électrophorèse (cuves et générateurs). Dans le second cas, c'est un automate d'analyse d'ADN composé d'un module d'électrophorèse et d'un logiciel d'analyse de taille de fragment développé sur une informatique "Macintosh". Ce système permet la mise en évidence simultanée du polymorphisme de plusieurs microsatellites (3 à 9) par animal et par gel grâce à l'utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents (fluorophores).

1.5. CALCULS

Comme il n'y a pas de relation de dominance entre les différents allèles d'un même microsatellite, les fréquences alléliques pour les 17 microsatellites et les 10 races ont été calculées par comptage direct. A partir des fréquences observées, les distances génétiques entre races ont été calculées en utilisant la distance standard de Nei (1972) et celle de Cavalli-Sforza (1967). Ces distances ont été à la base de la construction de phénogrammes (selon la méthode du "Neighbor Joining"). Une méthode de ré-échantillonnage aléatoire dite du "Bootstrap" (Felsenstein, 1985) a été utilisée pour tester la robustesse des arbres obtenus.

2. RÉSULTATS

2.1. FRÉQUENCES ALLÉLIQUES

Un ensemble de 8500 typages a été effectué dont 4800 en radioactivité et 3700 en fluorescence. L'examen des fréquences alléliques par race et par microsatellite suggère un certain nombre de remarques :

a) Le profil de répartition des fréquences alléliques est très différent pour des microsatellites ayant un nombre

d'allèles pratiquement identique. Ainsi, la plupart des allèles du microsatellite INRA 023 (14 allèles) sont détectés dans toutes les races alors que parmi les 13 allèles du microsatellite INRA 013, 6 allèles sont prépondérants.

b) Certains allèles d'un même microsatellite sont détectés dans une ou deux races seulement alors qu'ils sont absents des autres. L'allèle 9 du microsatellite INRA 032 est présent en race Limousine, Parthenaise et Maine-Anjou. Il n'a pas été détecté dans les 7 autres races. La situation inverse se produit également. Ainsi par exemple, l'allèle 5 du microsatellite INRA 072 n'est absent qu'en race Vosgienne.

c) Pour certains microsatellites, les fréquences alléliques sont très différentes d'une race à l'autre. C'est le cas de l'allèle 9 du microsatellite INRA 016 détecté à des fréquences de 17% en race Normande, 36% en race Holstein et 75,5% en race Jersiaise et de l'allèle 3 du même microsatellite qui est présent avec des fréquences de 23% en race Vosgienne et 2% en race Charolaise et en race Limousine.

2.2. PHÉNOGRAMMES

Il existe différentes méthodes de classification qui se distinguent par leurs hypothèses évolutives et leurs algorithmes. Les modèles d'évolution suivis par les microsatellites n'étant pas encore très bien identifiés, nous avons choisi de représenter les distances obtenues par la méthode dite du «Neighbor-Joining» qui n'impose pas l'hypothèse évolutive d'horloge moléculaire.

Malgré une forte corrélation statistique entre la distance standard de Nei et celle de Cavalli-Sforza, les phénogrammes obtenus ne sont pas identiques selon les distances utilisées.

Une méthode de ré-échantillonnage aléatoire, le bootstrap (Felsenstein, 1985) a été utilisée dans le but d'évaluer la confiance à accorder aux arbres obtenus. Après chaque ré-échantillonnage (N), un arbre est construit. En fin de «bootstrap», on est en possession de N arbres qui peuvent, éventuellement, être différents. Pour rechercher une représentation de ces arbres telle que leurs parties concordantes apparaissent clairement par rapport aux parties discordantes, en fin d'analyse, une représentation appelée «arbre consensus» est recherché, et les fréquences des différents branchements (valeurs de bootstrap) y sont reportées. La Figure 1 représente, après 500 ré-échantillonnages, les deux arbres consensus des deux distances utilisées. En accord avec les données historiques et biochimiques, quelques points communs, se dégagent, notamment les rapprochements des races Holstein et Maine-Anjou, d'une part, Montbéliarde et Vosgienne, d'autre part. Ces regroupements sont en accord avec les données historiques (Denis, 1983) et biochimiques (Grosclaude et al, 1990). Cependant, nous pouvons constater que le seuil de signification de 95% n'a pas été atteint, les regroupements (noeuds) obtenus sont dit instables.

3. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Les microsatellites ont été décrits pour la première fois il y a une dizaine d'années (Hamada et al, 1982). Très rapidement, ils se sont révélés très performants pour la construction de cartes génétiques et pour l'étude de généalogies. Cependant, leur utilisation en génétique des populations n'a réellement débuté qu'en 1989. Par exemple, des divergences génétiques entre différentes populations de mouflons

ont été mises en évidence, permettant de confirmer leur isolement reproducteur. Les microsatellites sont proposés au niveau international en tant que marqueurs pour des études de phylogénie et de relation entre races. Nos travaux s'inscrivent dans ce cadre. Les résultats obtenus, confirment l'existence d'un polymorphisme important et surtout d'une grande diversité de situations, soit entre marqueurs, soit entre races. La distribution des allèles révèle très finement la variabilité génétique présente dans les différentes races. Etant donné la diversité des situations observées, nous pouvons constater que le choix d'un marqueur de type microsatellite pour des études de population s'effectue de façon empirique et sa qualité s'évalue *a posteriori* alors qu'en cartographie génétique la détermination du PIC (polymorphism information content) suffit habituellement pour estimer la qualité d'un marqueur.

Alors que nous nous sommes imposés, dans la mesure du possible, une contrainte sur le choix des animaux (non apparentés) et sur les marqueurs microsatellites (localisés sur des chromosomes différents), la précision des résultats obtenus n'est pas celle attendue.

Plusieurs hypothèses peuvent, en la circonstance, être avancées:

- nos critères de choix des microsatellites n'ont pas été suffisamment restrictifs ou pertinents. Même s'ils sont localisés sur des chromosomes différents, dans l'ensemble, nous ne connaissons pas leur proximité avec des gènes

associés à des caractères sélectionnés. Parmi les 17 microsatellites certains comportent un nombre d'allèles trop important. Une moyenne de huit allèles par marqueur semble optimale et permet de réduire l'incertitude sur l'estimation des fréquences alléliques à partir d'un échantillon de 50 animaux par race. De plus, d'un point de vue technique, une telle situation permet d'exploiter au maximum la longueur de piste de migration sur les gels de polyacrylamide utilisés.

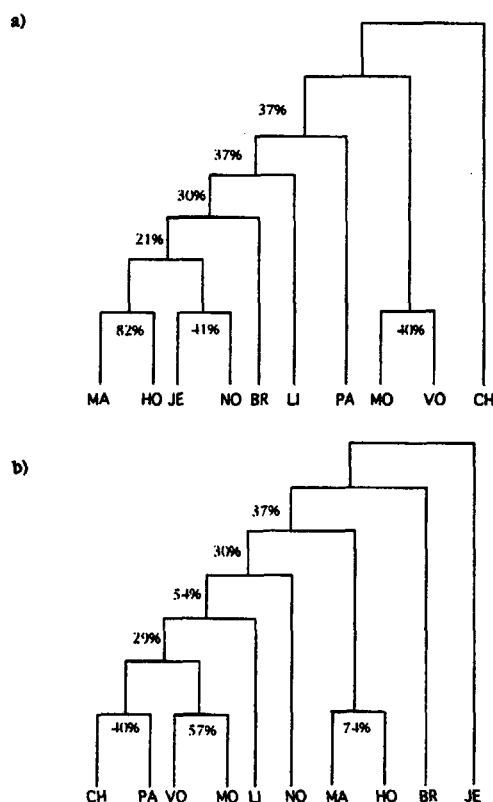
- les races bovines françaises n'ont pas cessé d'être croisées et leur fixation date du début du 19^{ème} siècle.

- les distances calculées, ne seraient pas les mieux adaptées au(x) modèle(s) d'évolution des microsatellites qui doivent encore être précisés.

A la question de savoir si les microsatellites sont des outils de choix pour l'analyse des relations entre races, il est encore difficile de répondre de façon catégorique. Au niveau international, dans le cadre du programme d'étude de la diversité génétique des espèces domestiques mis en place par la F.A.O. (Food and Agriculture Organisation), les marqueurs retenus pour effectuer cette analyse sont de type microsatellite (Barker, 1994). La confrontation de nos données avec les résultats qui découleront de ces projets, devrait permettre d'affiner l'analyse de la pertinence de l'outil microsatellite pour ce type d'étude et l'adéquation des méthodes de calculs de distances, fournissant ainsi des éléments de réponse à la question posée.

Figure 1

Phénogrammes consensus de 10 races bovines obtenus après 500 ré-échantillonnages calculés selon la méthode du « Neighbor Joining » d'après : a) les distances standard de Nei (1972) ; et b) les distances de Cavalli-Sforza (1967). Les pourcentages correspondent aux valeurs de bootstrap obtenues pour chacun des nœuds.



BR : Bretonne Pie Noire, CH : Charolaise, HO : Holstein, JE : Jersiaise, LI : Limousine, NO : Normande, MA : Maine-Anjou, MO : Montbéliarde, PA : Parthenaise, VO : Vosgienne.

RÉFÉRENCES

- BAKER A. C. M., MANWELL C. 1980. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 11, 127-150.
- BARKER J.S.F., 1994. An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. Report of a working group of the animal production and health division (FAO). June
- CAVALLI-SFORZA L. L., EDWARDS A. W. F., 1967. *Evolution*, 21, 550-570.
- DECHAMBRE P., 1913. *Traité de zootechnie. III. Les bovins.* Ch. Amat, Asselin et Houzeau, Paris.
- DENIS B., 1983. *Ethnozootecnie*, 32, 140-158.
- FELSENSTEIN J., 1985. *Evolution*, 39, 783-791.
- GROSCLAUDE F., 1974. Thèse de doctorat d'Etat, ès sciences naturelles, Université de Paris VII.
- GROSCLAUDE F., AUPETIT R., LEFEBVRE J., MERIAUX J., 1990. *Genet. Sel. Evol.*, 22, 317-338.
- HAMADA H., T. KAKUNAGA., 1982. *Nature*, 302, 396-398.
- JEANPIERRE M., 1987. *Nucleic Acid Res.*, 15, 9611.
- LAUVERGNE JJ., 1989. In MOLENAT M. et VERRIER E. (Eds), *La gestion des ressources génétiques des espèces animales domestiques.* BRG, Paris, 9-18.
- MOAZAMI-GOUDARZI K., VAIMAN D., MERCIER D., GROHS C., FURET JP., LEVÉZIEL H., MARTIN P., 1994. *Genet. Sel. Evol.*, 26, suppl 1, 155s-165s.
- NEI M., 1972. *Am. Nat.*, 106, 283-292.
- NEI M., 1978. *Genetics*, 89, 583-592.
- NEI M., ROYCHOUDHURY A. K., 1974. *Genetics*, 76, 379-390.
- PEPIN L., AMIGUES Y., LEPINGLE A., BERTHIER JL., BENSALD A., VAIMAN D., 1995. *Heredity*, 74, 53-61.
- SANSON A., 1884. *Traité de Zootechnie, tome 4.* Librairie agricole de la Maison Rustique, Paris, 3ème édition.
- STALLINGS R. L., FORD A. F., NELSON D., TORNEY D. C., HILDEBRAND C. E., MOYZIS R. K., 1991. *Genomics*, 10, 807-815.
- STEFFEN P., EGGEN A., DIETZ B., WOMACK J. E., STRANZINGER G., FRIES R., 1993. *Anim. Genet.*, 24, 121-124.
- VAIMAN D., MERCIER D., MOAZAMI-GOUDARZI K., EGGEN A., CIAMPOLINI R., LÉPINGLE A., VELMALA R., KAUKINEN J., VARVIO S., MARTIN P., LEVEZIEL H., GUÉRIN G., 1994. *Mamm. Genome*, 5, 288-297.
- VERRIER E., COLLEAU JJ., FOULLEY JL., 1989. In MOLENAT M. et VERRIER E. (Eds), *La gestion des ressources génétiques des espèces animales domestiques.* BRG, Paris, 61-70.
- VU TIEN KHANG J., 1983. *Genet. Sel. Evol.*, 15, 263-298.

