

Validation d'une procédure de traçabilité des viandes bovines par marquage moléculaire

Validation of a traceability procedure for bovine meat using molecular markers

M. SAN CRISTOBAL-GAUDY (1), G. RENAND (2); Y. AMIGUES (3); M.-Y. BOSCHER (3); H. LEVEZIEL (4); B. BIBE (5)

(1) Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA, BP 27, 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX

(2) Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA, 78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX

(3) LABOGENA, 78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX

(4) Laboratoire de Génétique Biochimique, INRA, 78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX

(5) Département de Génétique Animale, INRA, BP 27, 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX

INTRODUCTION

Dans le cadre des efforts développés actuellement pour améliorer et sécuriser la traçabilité des bovins et produits dérivés, et compte tenu de la disponibilité d'un grand nombre de marqueurs moléculaires de type microsatellites, une expérience a été mise en place pour établir et valider une procédure d'identification individuelle des viandes. En effet, dans la chaîne "de la ferme à l'étal", il existe des systèmes d'identification différents au fur et à mesure des opérations; en particulier, il est difficile de reporter l'identification Pérenne Généralisée qui existe sur le passeport bovin au niveau des pièces de viande commercialisées par le détaillant.

MATERIEL ET METHODES

147 animaux provenant de deux domaines expérimentaux INRA ont été prélevés au moins deux fois, soit en vif (sang, poil), soit après abattage (sur la viande, après 24h ou 15j), soit un total de 545 prélèvements. Deux types de prélèvement de viande ont été étudiés: au scalpel, et à l'aiguille à biopsie. L'ADN a été extrait pour tous ces échantillons, et analysé avec 11 marqueurs microsatellites. Leur choix a reposé sur la répartition sur le génome (1 voire 2 par chromosome), sur leur polymorphisme (de 5 à 12 allèles), sur leur facilité d'amplification (connaissance de ces marqueurs dans les programmes de recherche de QTL, de diversité, de recherche de paternité, ...), et leur facilité de typage simultané (multiplex). Le polymorphisme de ces marqueurs a été analysé à l'aide d'un séquenceur automatique ABI377; les tests ont tous été réalisés en aveugle. L'analyse statistique a reposé sur la méthode du maximum de vraisemblance prenant en compte d'inévitables bien que rares erreurs de typages. Cette analyse statistique a en effet été réalisée sur les données brutes de typage.

RESULTATS

Sur les 545 échantillons, l'extraction de l'ADN a été particulièrement efficace sur la viande, quels que soient son mode de prélèvement et sa maturation (tab. 1). Par contre, pour environ 1/4 des poils, il a fallu refaire l'extraction. Cet ADN s'est avéré pourtant de bonne qualité puisque sur l'ensemble des marqueurs étudiés le taux d'absence d'amplification est faible (tab. 1 et 2). Une seule réaction de PCR a en général été nécessaire pour obtenir les produits d'amplification. Le jeu de marqueurs a effectivement mis en évidence un polymorphisme élevé dans la population expérimentale, le taux d'hétérozygotie allant de 0,53 à 0,87 et permettant d'avoir un taux d'hétérozygotie global de 0,97 avec les 11 marqueurs. Le taux d'absence d'amplification selon le marqueur considéré varie de 0,2% pour le plus facile à 5,1% pour le plus difficile (tab. 2). Dans la mesure où il existait au moins deux prélèvements par animal (de 2 à 6 dans cette étude), il a été possible d'évaluer le taux de génotypes incompatibles liés à des erreurs inévitables dans la technique moléculaire. Sur l'ensemble des marqueurs, ce taux d'incompatibilité ou de "génotypes faux" est de 0,8%, en général inférieur à 2% sauf pour un marqueur pour lequel ce taux s'élève à 3,1%. En fait, il s'avère que les 3/4 de ces "génotypes faux" sont dus à la non visualisation d'un des deux allèles lorsque l'individu est hétérozygote au locus étu-

dié. Ce phénomène d'"allèle nul" est bien connu pour les marqueurs de type microsatellite. Dans le cas d'une utilisation en routine de cette méthode, les échantillons pour lesquels de telles discordances sont révélées, sont systématiquement ré-analysés, permettant de lever ces ambiguïtés.

Tableau 1
Extraction de l'ADN et amplification des marqueurs

Type d'échantillon	Nombre d'échantillons	Extraction refaite	Marqueurs non amplifiés
Sang	110	6,4%	0,2%
Poils	142	23,8%	1,8%
Viande scalpel	201	0,7%	0,2%
Viande aiguille	92	0,7%	3,5%

Le traitement statistique de ces données a par ailleurs permis de mettre en évidence des erreurs d'identification des échantillons qui avaient été générées dans cette expérimentation au moment de la réalisation des prélèvements, d'où l'attention particulière qu'il faudra porter à cette étape. Il a aussi été établi que lorsqu'un nombre suffisant de marqueurs est utilisé, la méthode proposée possède une grande fiabilité (tab. 3), y compris dans le cas de demi- ou plein-frères: une traçabilité parfaite des 545 échantillons est obtenue avec 11 ou 8 locus convenablement choisis, mais pas en deçà.

Tableau 2
Erreurs de typage (statistiques sur 10 des 11 locus)

	Total	Minimum	Maximum
Absence d'amplification	1,1%	0,2%	5,1%
Génotypes faux	0,8%	0%	3,1%

Tableau 3
Probabilités que deux individus aient même génotype

Type d'individu	11 locus	8 locus	5 locus
Non apparentés	5.10^{-12}	$7,5.10^{-10}$	$7,2.10^{-5}$
Demi-frères	$5,7.10^{-9}$	$1,9.10^{-7}$	$9,8.10^{-4}$
Plein frères	$4,6.10^{-5}$	$3,9.10^{-4}$	$1,9.10^{-2}$

CONCLUSION

Une procédure de traçabilité des viandes bovines, basée sur l'identification individuelle des animaux et produits dérivés à l'aide de microsatellites, a été mise au point. Sa faisabilité a été validée. Son application à plus grande échelle peut désormais être envisagée; une réflexion est engagée pour arrêter les modes de gestion des échantillons et définir des domaines d'utilisation pertinents. Le coût de la méthode est fonction de la quantité d'échantillons à analyser.

Remerciements: Nous remercions la société INTERBEV et le CIV pour leur soutien financier (contrat B01536).