

TRAÇABILITE DES PRODUITS D'ORIGINE BOVINE AU MOYEN DE TESTS MOLECULAIRES PORTANT SUR LES GENES CONTROLANT LA COLORATION DE LA ROBE

S. GUIBERT¹, M. GIRARDOT¹, F. ROUZAUD¹, J. MARTIN¹, M-P. LAFORET¹, F. MENISSIER², H. LEVEZIEL¹, M. BOICHARD³, R. JULIEN¹, A. OULMOUDEN¹

¹ Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061, INRA/Université de Limoges, Faculté des Sciences, Limoges ; ² Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA, Jouy-en-Josas ; ³ Laboratoire de Génétique Factorielle, INRA, Jouy-en-Josas

Introduction

Les crises alimentaires survenues récemment en Europe (ESB, hormones, dioxine), affectant notamment la filière viande, ont suscité de nouvelles exigences chez les consommateurs en matière de caractérisation, de traçabilité et de sécurité sanitaire des aliments qui leur sont proposés. Dans ce contexte, les consommateurs désirent être informés sur l'origine des produits : la notion de terroir est devenue essentielle pour les filières de qualité, car associée à un système d'élevage valorisant les races locales, soucieux du bien-être des animaux et respectueux de l'environnement. Cependant, il n'existe pas actuellement de critère objectif simple pour garantir l'origine raciale d'un produit.

Les marqueurs génétiques sont des outils puissants pour divers objectifs incluant la cartographie des génomes et l'identification de QTLs. Qu'ils soient anonymes (microsatellites) ou liés à un phénotype (gènes de la coloration, par exemple), ils constituent également des outils efficaces pour la traçabilité des denrées alimentaires, en particulier dans le cas des produits carnés. Mais, les méthodes basées sur l'emploi de marqueurs microsatellites, très performantes en terme de traçabilité individuelle, sont insuffisantes en matière de traçabilité raciale : si elles permettent d'affecter un individu à une race avec une probabilité élevée, elles ne conviennent pas pour certifier la conformité à des critères précis comme ceux concernant la couleur de la robe, spécifiés dans le standard racial. Nos travaux, dédiés à l'étude du polymorphisme du gène extension et d'autres gènes de la coloration, montrent que comprendre leur rôle dans la coloration de la robe conduit à élaborer des outils permettant d'attester l'origine raciale et la typicité d'un produit de qualité, issu d'une race bovine connue.

Matériel et méthodes

Des animaux non-apparentés et appartenant à différentes races bovines (Tableau 1), possédant chacune une couleur de robe caractéristique, ont été étudiés notamment pour le génotype du gène extension. L'ADN génomique a été préparé à partir d'échantillons de sang selon une technique standard d'extraction. La partie codante du gène *MC1R* (ou gène extension) a été obtenue par amplification PCR et l'identification des différents allèles de *MC1R* pour chacune des races étudiées a été effectuée par PCR-RFLP (Rouzaud *et al.*, 2000).

La partie codante des autres gènes a été obtenue par amplification PCR à l'aide d'amorces dégénérées déduite de la comparaison de séquences des gènes humain et murin. Leur polymorphisme a été analysé par séquençage.

Résultats et discussion

Les allèles *MC1R* chez le bovin

Le gène *MC1R* code pour le récepteur mélanocytaire (Mclr) de l'hormone α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) qui appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La fixation de l' α -MSH au récepteur stimule, via une voie de transduction du signal, l'activation des gènes de la mélanogenèse, et favorise la synthèse de pigment noir (eumélanine). L'autre ligand du récepteur, produit du gène agouti, « antagonise » l'action de l'hormone et contrôle la synthèse de pigments rouge/jaune (phaeomélanine). Plusieurs allèles de *MC1R* ou d'autres gènes ont été décrits chez la souris, animal modèle (Nakamura *et al.* 2002), et ils conduisent à des phénotypes de coloration variables, dans les gammes du noir et du rouge.

Nous avons mis en évidence 4 allèles (*E*, *e*, *E1*, *E^D*) du gène *MC1R* chez les bovins. L'allèle « sauvage » *E*, code un récepteur de 317 acides aminés et son activité serait modulable par la liaison de l' α -MSH et la protéine Agouti. L'allèle *E1* se caractérise, comparativement à l'allèle *E* de référence, par une duplication de 12 nucléotides, soit 4 acides aminés supplémentaires au niveau de la troisième boucle intra-cytoplasmique du récepteur (boucle impliquée dans l'interaction de la protéine G lors de l'activation du récepteur par l' α -MSH). Cette modification structurale affecterait la transduction du signal du récepteur et par là même participe à la définition de la couleur de la robe. Les 2 autres allèles sont caractérisés, pour *e*, par une délétion qui change le cadre de lecture et conduit à un récepteur tronqué, et pour *E^D*, par une mutation qui aboutit à la substitution d'une leucine par une proline, rendant le récepteur constitutionnellement actif et engendrant le phénotype noir.

Ces différents polymorphismes conduisent à l'apparition-disparition de sites de clivage pour les enzymes *AciI* et *BsrI*. Aussi, après amplification d'un fragment d'ADN génomique à l'aide d'amorces PCR appropriées et digestion des amplifiats obtenus par les 2 endonucléases, il est possible de déterminer le génotype d'un animal selon une analyse en PCR-RFLP des profils obtenus. La Figure 1 donne le principe du test de génotypage.

Autres gènes de la coloration

Des démarches similaires à celles entreprises pour le gène extension le sont pour les gènes agouti (*ASIP*), tyrosinase (*TYR*), *TRP1*, *TRP2*, *RAB27A*, *RAB38*, melanophilin (*MLPH*) etc ...

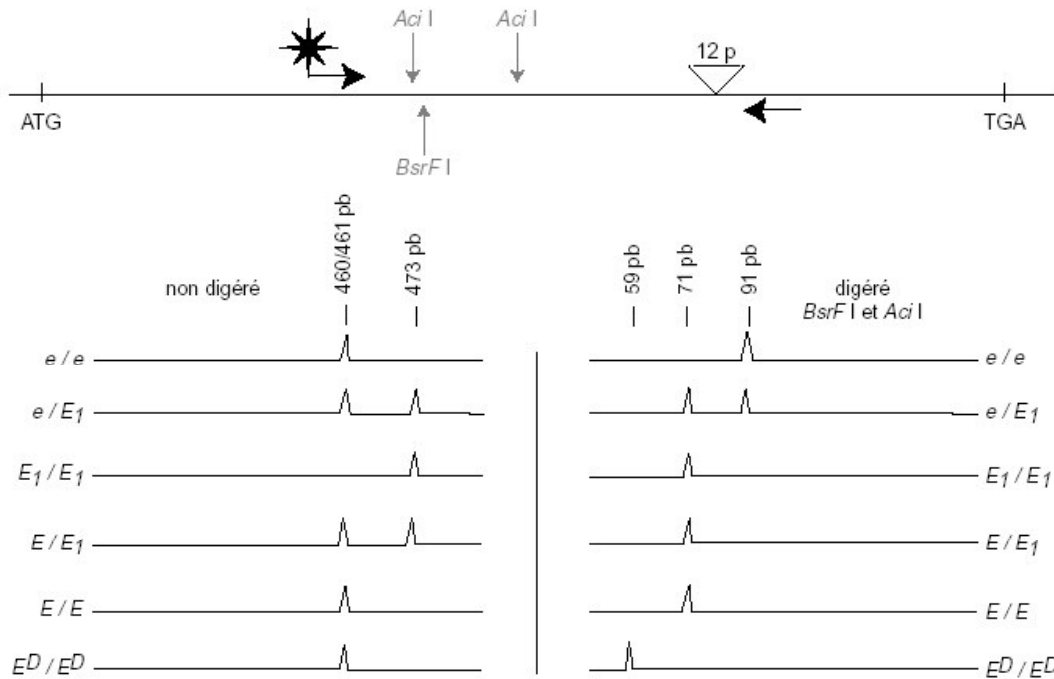


Figure 1. Les amorces sont choisies de manière à amplifier un fragment recouvrant la zone où sont situées les mutation/délétion/insertion. Après double digestion, le génotype est déterminé par l'analyse de la taille des fragments

Races	Génotypes				
	<i>e/e</i>	<i>E₁/E₁</i>	<i>E/E₁</i>	<i>E/E</i>	<i>E^D/E^D</i>
Aubrac	-	43	18	7	-
Gasconne	-	23	23	18	-
Blonde d'Aquitaine	27	-	-	-	-
Charolaise	59	-	-	-	-
Limousine	42	-	-	-	-
Salers	56	-	-	-	-
Normande	-	-	-	75	-
Prim'Holstein	-	-	-	-	87

Le **Tableau 1** récapitule des exemples de génotypes rencontrés au gène *MC1R* (extension) chez quelques centaines d'individus appartenant à diverses races bovines françaises

Conclusion

Les premières analyses du polymorphisme du gène *MC1R* (Tableau 1) montrent qu'une assez bonne discrimination entre les races ou des groupes de races peut être constatée. A titre d'exemple, des produits issus de bovins de race Holstein se caractérisent par la présence de l'allèle *E^D*. Néanmoins, les allèles du gène *MC1R* ne permettent pas de discriminer, à eux seuls, les races au sein d'un même groupe (Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine ou Salers par exemple).

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggèrent que la régulation transcriptionnelle du gène *MC1R* diffère selon races. Cette observation pourrait être exploitée pour améliorer les méthodes de traçabilité recherchées. Par ailleurs, la mise en évidence d'autres allèles de gènes de coloration favoriserait la construction d'une combinaison allélique qui devrait aboutir à une identification fine des diverses populations bovines. Dans cette perspective, le polymorphisme des gènes de la famille tyrosinase (*TYR*, *TRP1*, *TRP2*), impliqués directement dans la synthèse des mélanines, ainsi que les gènes impliqués dans le transport des mélanosomes (organites mélanocytaires, siège de la synthèse des mélanines) vers le poil en croissance, sont en cours d'étude.

Références

- Rouzaud, F., Juliette, M., Gallet, P.F., Delourme, D., Goulement-Leger, V., Amigues, Y., Ménessier, F., Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A., 2000. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the *extension* gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet. Sel. Evol.* **32**, 511-520.
- Nakamura, M., Tobin, D.J., Richards-Smith, B., Sundberg, J.P., Paus, R., 2002. Mutant laboratory mice with abnormalities in pigmentation : annotated table. *Journal of Dermatological Science*, **28**, 1-33.

Remerciements

Nous remercions les collègues des différentes UPRA et de Labogena qui nous ont aidés pour l'obtention des échantillons de sang ou d'ADN d'individus des différentes races bovines françaises. Les tests de génotypage ont été effectués par Labogena à Jouy-en-Josas (contact : Y. Amigues).