

ASSOCIATION ENTRE POLYMORPHISME DES GENES DE LA SYNTHETASE DES ACIDES GRAS ET DE L'ENZYME MALIQUE ET VARIABILITE DE L'ETAT D'ENGRAISSEMENT CHEZ LA DINDE

Sourdoux Michel^{1,2}, Delabrosse Yvette², Douaire Madeleine¹

¹ Laboratoire de génétique animale, INRA-ENSA de Rennes, 65 rue de St Briec, 35042 Rennes Cedex

² Bétina Sélection, Trédion, 56250 Elven

Résumé

Une recherche d'associations entre polymorphisme d'ADN et variabilité de l'état d'engraissement est effectuée chez la dinde. Deux échantillons d'animaux, de structures différentes, permettent en particulier l'étude de deux RFLP sur deux gènes candidats, celui de la synthétase des acides gras et celui de l'enzyme malique. Une première association est suggérée après l'analyse effectuée sur 32 femelles prélevées au hasard. La deuxième analyse est réalisée sur un échantillon constitué de 8 familles de demi/pleines soeurs de père hétérozygote pour l'un des RFLP précédemment cités. Sur ce dispositif mieux équilibré et permettant de séparer les effets des gènes candidats de ceux des autres polygènes, les associations entre polymorphismes et variabilité de l'engraissement sont confirmées, identifiant ainsi les gènes de la synthétase des acides gras et de l'enzyme malique comme deux candidats majeurs du déterminisme de la variabilité de l'engraissement chez la dinde.

Introduction

La connaissance partielle du déterminisme génétique d'un caractère d'intérêt zootechnique devrait prochainement permettre de compléter les méthodes de sélection actuellement basées sur l'application de la théorie de la génétique quantitative. Pour cela, il convient de rechercher des structures génétiques associées à la variabilité du caractère. Compte tenu des connaissances acquises sur les mécanismes biochimiques sous-jacents à la variabilité de l'engraissement chez les oiseaux, une étude du polymorphisme d'ADN de quelques gènes dits candidats a pu être proposée chez la dinde. Il s'agit des gènes codant pour des enzymes clés de la synthèse hépatique des lipides, à savoir, l'acétyl coA carboxylase, la synthétase des acides gras, la 9 désaturase et l'enzyme malique. Le choix de ces enzymes est en partie guidé par les résultats des mesures d'activité (Bannister et al., 1984 ; Legrand et al., 1987 ; Asante et Bulfield, 1988 ; Legrand et Hermier, 1992) et de taux d'ARN_m (Douaire et al., 1992) obtenus à partir de poulets de lignées sélectionnées de façon divergente sur leur état d'engraissement (Leclercq et al., 1980).

Plusieurs RFLP des gènes précédemment cités ont été identifiés sur différentes souches de dindes (Sourdoux et al., 1996). Les associations entre génotypes et niveaux d'engraissement sont ici étudiées pour quatre d'entre eux dans une souche. L'accent est mis en particulier sur un polymorphisme du gène de la synthétase des acides gras, MspI/pF5, présentant 3 haplotypes B, C et F, et un polymorphisme du gène de l'enzyme malique,

HindIII/em, également présent sous trois formes alléliques A, D et F. Les deux autres polymorphismes pris en compte dans cette étude concernent les gènes de l'acétyl coA carboxylase et de la 9 désaturase, dénommés respectivement, TaqI/acc, MspI/9Sma3.7.

1. Matériels et méthodes

1.1. Les animaux

Les travaux sont conduits sur une lignée commerciale en sélection (Bétina Sélection). Un premier échantillon est constitué de 32 femelles. Ces animaux prélevés au hasard sont majoritairement non-apparentés.

Un deuxième échantillon de 84 animaux est constitué de 8 familles de demi/pleines soeurs de père hétérozygote pour au moins un des deux RFLP, du gène de l'enzyme malique, HindIII/em, ou du gène de la synthétase des acides gras, MspI/pF5. Il s'agissait ainsi d'équilibrer les génotypes de ces deux RFLP dans la descendance.

1.2. Typages

L'ADN génomique des animaux est extrait à partir des cellules sanguines après séparation des noyaux, digestion à la protéinase K, et précipitation des protéines en solution saline (Miller et al., 1988). Les 4 RFLP sont obtenus après digestion soit par HindIII, MspI, ou TaqI et hybridation par les sondes moléculaires décrites TABLEAU 1.

TABEAU 1 : Caractéristiques des sondes utilisées

Gène	Sonde	Nature du fragment	Origine
Acétyl coA carboxylase	acc	ADN génomique/2,3kb (incluant le 1er exon codant)	El Khadir-Mounier et al., 1996
Synthétase des acides gras	pF5	ADNc partiel/2kb	Le Fur et al., 1996
Enzyme malique	em	ADNc complet/2kb	Back et al., 1986
9 désaturase	9 Sma3. 7	ADN génomique/3,7kb (incluant exons 4, 5 et en partie 6)	Langlois, 1995

1.3. Variables étudiées

L'état d'engraissement est évalué par trois types de mesure. Sur le premier échantillon d'animaux, l'évaluation a lieu in vivo par une mesure aux ultrasons (Rusell, 1987) puis après l'abattage par le calcul du rapport de poids de peau et gras sous cutané de la cuisse sur le poids de cuisse. Sur le deuxième échantillon ces deux mesures sont complétées d'un dosage direct des lipides de la cuisse, par détermination de l'extrait à l'oxyde diéthylique (extracteur Soxtec) afin d'améliorer la précision de l'estimation de l'état d'engraissement.

1.4. Analyses statistiques

La comparaison des niveaux d'engraissement en fonction des génotypes aux divers RFLP est effectuée par analyse de variance. Pour l'analyse du premier échantillon, le modèle suivant est appliqué :

$$y_{ijk} = \mu + \sum RFLP_{ij} + e_{ijk}$$

où y_{ij} est la mesure du caractère pour l'individu k de génotype j au RFLP i .

Pour le deuxième échantillon, l'effet associé au génotype de chaque RFLP est testé dans un modèle partiellement hiérarchique incluant un effet père et mère intra père comme suit :

$$y_{ijkl} = \mu + P_i + M_j(P_i) + RFLP + e_{ijkl}$$

où y_{ijkl} est la mesure de l'individu de génotype k de mère j et de père i . Pour l'analyse de la teneur en lipides (extraction Soxtec), ainsi que pour la mesure

aux ultrasons le poids vif est intégré comme covariable. L'introduction d'un effet père et mère intra père permet de prendre en compte le caractère polygénique du déterminisme de l'engraissement et ainsi de mieux évaluer les effets éventuels associés aux gènes polymorphes étudiés.

Une analyse des effets associés aux haplotypes (effets moyens de substitution) des deux RFLP HindIII/em et MspI/pF5 a également été réalisée sur cet échantillon à partir du calcul des contrastes suivant (Pinard et al., 1993) :

$$\sum_k (G_{hk} - G_{rk})$$

où G_{hk} et G_{rk} sont les niveaux d'engraissement moyens des génotypes où sont respectivement présents les haplotypes h (haplotype étudié) et r (haplotype pris comme référence).

2. Résultats

Aucune association n'a été observée entre le niveau d'engraissement et les génotypes aux RFLP des gènes de l'acétyl coA carboxylase (TaqI/acc), de la 9 désaturase (MspI/9 Sma 3,7).

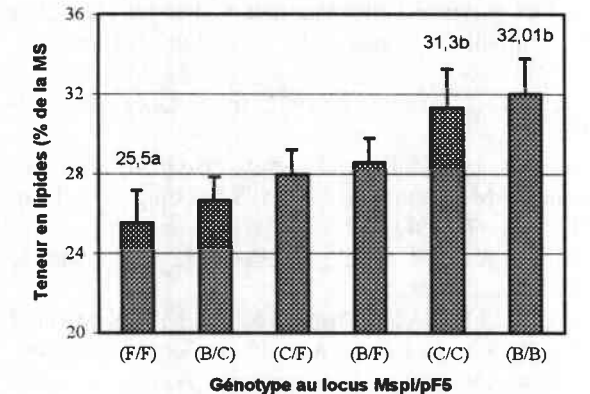
2.1. Etude du polymorphisme MspI/pF5 du gène de la synthétase des acides gras.

L'analyse des animaux du premier échantillon suggère l'existence d'une association statistique entre le génotype au polymorphisme du gène de la synthétase des acides gras, MspI/pF5, et le niveau d'engraissement. En effet, les probabilités du test F d'analyse de variance sont de 0,11 et 0,08 respectivement pour la mesure par ultrasons et pour le rapport de poids de peau sur poids de cuisse. Dans cet échantillon où 5 des 6 génotypes sont représentés (le génotype C/C est absent), les animaux les plus maigres sont de génotype B/F puis F/F. Entre 1 et 2 écart-types phénotypiques séparent ces deux génotypes des trois autres.

Cette liaison entre le polymorphisme MspI/pF5 et l'état d'engraissement semble être confirmée sur l'échantillon constitué de 8 familles de demi/pleines soeurs. La probabilité associée à l'effet du génotype MspI/pF5 est respectivement pour les variables de mesure aux ultrasons, de rapport de poids de peau sur poids de cuisse, et de teneur en lipides, de 0,07, 0,29 et 0,10. La figure 1 présente les moyennes de teneur en lipides de la cuisse en fonction du génotype des animaux. Il apparaît clairement entre les génotypes B/B et C/C d'une part, et le génotype F/F d'autre part, une différence d'environ 1,5 écart-type, différence significative (au seuil 5%) dans le cadre de la comparaison multiple des moyennes. Ce classement suggère donc (comme dans l'analyse du premier

échantillon d'animaux) que l'haplotype F est associé à une diminution de l'état d'engraissement ou que les haplotypes B et C sont associés à une augmentation de la teneur en lipides. Cette tendance peut être corroborée par l'analyse des effets associés à chaque haplotype, effets moyens de substitution (Falconer, 1989), calculés par la méthode des contrastes. Ainsi la substitution (au hasard) d'un haplotype B par un haplotype F entraîne, dans l'échantillon d'animaux étudié, une diminution moyenne de 1,72% de la teneur en lipides ($p=0,12$).

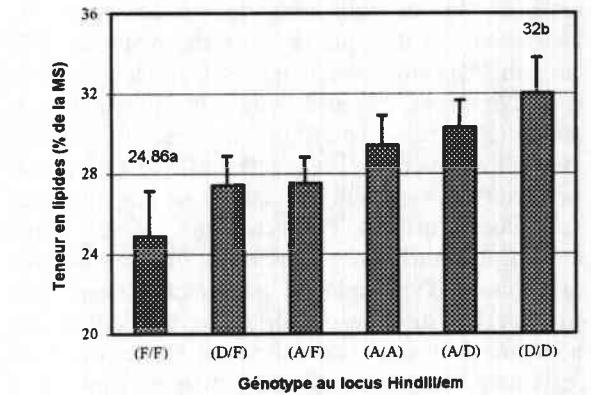
FIGURE 1 : Teneur en lipides de la cuisse (en pour-cent de la matière sèche) selon le génotype au locus MspI/pF5



2.2. Etude du polymorphisme HindIII/em du gène de l'enzyme malique.

Dans le premier échantillon, une association entre le génotype au polymorphisme HindIII/em et l'état d'engraissement estimé par le rapport de poids de peau sur poids de cuisse est suggérée par les résultats de l'analyse de variance ($p=0,15$). Toutefois, cette tendance ne semble pas se retrouver lorsque l'état d'engraissement est estimé par ultrasons (la probabilité du test F est de 0,50). Cette divergence en fonction de la méthode d'estimation de l'état d'engraissement se confirme dans l'analyse de l'échantillon de structure familiale. En effet, alors que la probabilité du test F est de 0,85 pour l'analyse de la mesure aux ultrasons suggérant une absence d'association entre le polymorphisme du gène de l'enzyme malique et la mesure de l'adiposité par ultrasons, elle est de 0,33 et 0,30 pour respectivement le rapport de poids de peau sur poids de cuisse et la teneur en lipides de la cuisse. Bien que les probabilités soient encore élevées pour ces deux dernières variables, la comparaison des moyennes par génotype montre une différence (significative au seuil de 5%) entre les animaux de génotypes F/F (maigre) et D/D (gras). La différence entre ces deux groupes est d'environ 1,3 écart-type phénotypique (FIGURE 2).

FIGURE 2 : Teneur en lipides de la cuisse (en pour-cent de la matière sèche) selon le génotype au locus HindIII/em



L'analyse des effets associés aux haplotypes du polymorphisme HindIII/em conforte l'hypothèse d'association avec les variables de poids de peau sur poids de cuisse ou de teneur en lipides de la cuisse (TABLEAU 2). Ainsi, le classement de l'ensemble des génotypes, et les effets de substitution des trois haplotypes suggèrent l'existence de trois niveaux d'engraissement différents associés aux trois haplotypes et se combinant de façon quasi strictement additive.

TABEAU 2 : Effets moyens de substitution des haplotypes au locus HindIII/em pour les variables d'estimation de l'engraissement

Variable	Haplo type	Effet moyen de substitution	Probabilité du contraste
Teneur en lipides de la cuisse (% de la MS)	A	2,06 ± 1,47	0,17
	D	3,18 ± 1,48	0,03
	F	0	
Mesure aux ultrasons (pts)	A	1,80 ± 3,01	0,55
	D	2,13 ± 2,98	0,47
	F	0	
Rapport de poids de peau sur poids de cuisse (%)	A	0,69 ± 0,42	0,10
	D	0,60 ± 0,41	0,14
	F	0	

Discussion et conclusion

L'ensemble de ces résultats tend à démontrer l'existence d'une association entre un polymorphisme du gène de la synthétase des acides gras, un polymorphisme du gène de l'enzyme malique, et la variabilité de l'engraissement chez la dinde. La portée de ces résultats est principalement limitée par la faible taille des échantillons sur lesquels ont été effectués ces analyses, et par le fait que l'effet testé sur l'état d'engraissement est, dans les modèles statistiques utilisés, directement affecté aux polymorphismes typés. L'étude de la transmission intra famille d'un haplotype par rapport à un autre, sur un échantillon de grande taille, permettrait une meilleure analyse et une validation de ces résultats. Cependant, les résultats sont obtenus dans deux échantillons indépendants et de structures différentes (animaux non apparentés, familles de demi/pleines soeurs), ainsi que dans une autre souche de dinde d'origine génétique différente (données non présentées, Sourdioux et al., 1996). Ils permettent donc de considérer les gènes de la synthétase des acides gras et de l'enzyme malique comme des candidats majeurs dans l'explication de la variabilité de l'état d'engraissement chez la dinde.

Références

- Asante F.A., Bulfield G., 1988.in:Leanness in domestic birds, INRA Butterworths, London, 223-228.
- Back D.W., Wilson B.S., Morris S.M., Goodridge A.G., 1986, J. Biol. Chem, 261, 12555-12561.
- Bannister D.W., Lee A., Whitehead C.C., Griffin H.D., 1984, Int. J. Biochem., 16, 1301-1305.
- Douaire M., Le Fur N., El Khadir-Mounier C., Langlois P., Flamant F., Mallard J., 1992, Poult. Sci., 71, 1911-1920.
- Falconer D.S., 1989.in:Introduction to quantitative genetics, Longman Group Ltd, London, pp 438.
- Leclercq B., Blum J.C., Boyer J.P., 1980, Br. Poult. Sci., 21, 107-113.
- Langlois P., 1995, Thèse de l'ENSA de Rennes.
- Le Fur N., El Khadir-Mounier C., Powell R.S., Diot C., Mallard J., Douaire M., 1996, Eur. J. Biochem., 240, 323-330.
- Legrand P., Hermier D., 1992, Int. J. Obes., 16, 289-294.
- Legrand P., Mallard J., Bernard-Griffiths M.A., Douaire M., Lemarchal P., 1987, Comp. Biochem. Physiol., 87B, 789-792.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., 1988, Nucleic Acids Res., 16, 1215.
- Pinard M.H., Van Arendonk J.A.M., Nieuwland M.G.B., Van Der Zijpp A.J., 1993, Génét. Sél. Evol., 191-203.
- Russeil P., 1987, Thèse de l'Université de Rennes I.
- Sourdioux M., Douaire M., Delabrosse Y., 1996, Poult. Sci., 75, 1018-1026.