



Les programmes français de recherche de QTL de fertilité chez les bovins laitiers

Mathieu Gautier

LGBC-INRA (Jouy-en-Josas)

**Journée de formation CSAGAD / Institut de l'Élevage
Paris, 15 janvier 2008**

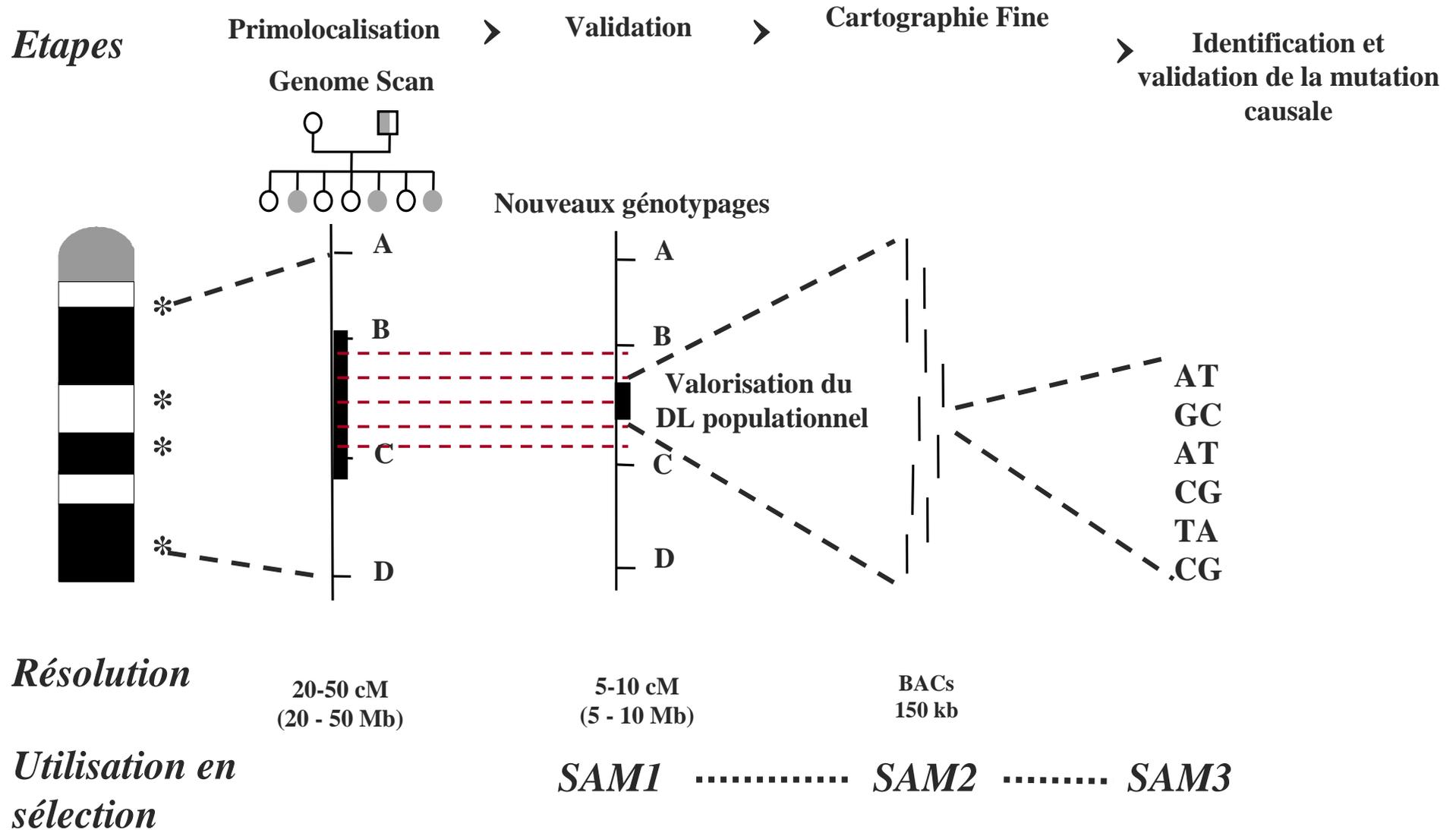
Les problèmes liés à la fertilité

- Fertilité: ensemble des évènements de la fécondation à la mise bas
- Baisse de la fertilité des vaches laitières dans les pays industrialisés
 - En France : ▼ de 15% du TNR entre 1988 et 1997 (Bousquet, 2004)
 - Aux Pays Bas : ▼ de 55% à 45% en 10 ans du taux de réussite à la 1ère IA (Jorristma et al., 2000)
 - Aux USA : ▲ de 1,75 à 3 du nombre d'IA/conception ces 20 dernières années (Lucy et al.,2001)
- Conséquences sur la rentabilité des exploitations
 - Baisse de la quantité de lait produite par jour de vie productive
 - Pertes liées au coût de l'IA
 - Augmentation du taux de réforme

Limites de la sélection classique

- Corrélation génétique négative avec les caractères de production
 - Depuis 1998 en France:
 - réorientation des objectifs de sélection: plus de poids économique à la fertilité femelle
 - Calcul d'un index fertilité femelle (succès/échecs à l'IA)
- Limites actuelles
 - L'index "fertilité" présente une faible héritabilité ($h^2 < 0.02$)
 - Difficulté de définition et/ou de mesure du caractère
- Apports attendus
 - Grande variabilité génétique observée sur les indices actuels
 - Intégration de l'information moléculaire: assister les méthodes classiques
 - Préalable: recherche de QTL

La cartographie de QTL



Les dispositifs de recherche de QTL

- En population expérimentale
 - Lignées issues d'expériences de sélection
 - Troupeau "MARC Twinning Rate"
 - Composite: HOL, ANG, CHA, BRU...
 - Taux de gémellité passé à 50% en 30 ans (vs 2% si non sélectionnée)
 - Troupeau Rouge des Prés « INRA-La grêleraie »:
 - Rouge des près
 - Taux de gémellité passé de 5% à 25% en 30 ans
- Limites
 - Temps de génération des bovins très long (>6 ans)
 - Nécessité de gros moyens (unités expérimentales)
 - Nombre réduit de caractères étudiés (en condition contrôlable)

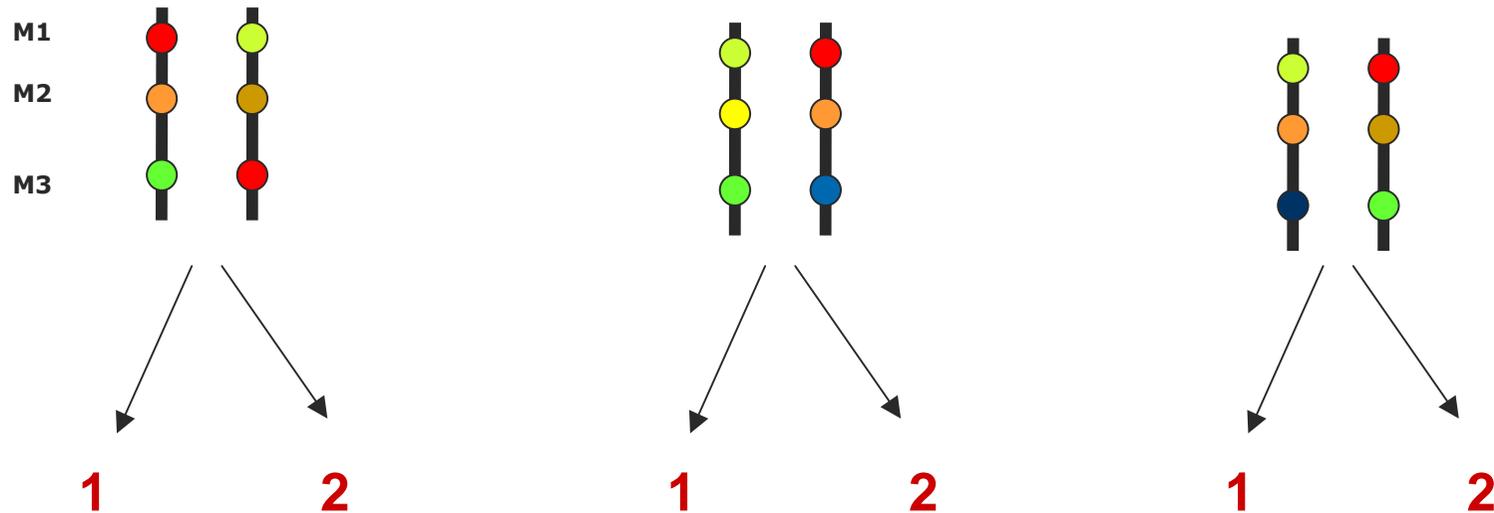
Les dispositifs de recherche de QTL

- Dans les populations bovines laitières exploitées:
 - Large diffusion de l'IA \Rightarrow de nombreuses familles de demi-germains
 - 2 types de dispositifs “naturels”:
 - “Grand daughter design” et “Daughter (ou Son!) Design”:
 - Les pères et les fils sont génotypés
 - GDD: Phénotype des Fils= Valeur génétique évaluée par testage sur descendance (ex TNR “femelle”)
 - DD: Phénotype des Fils= performance propre (ex TNR “mâle”, qualité de semence)
 - A nombre de génotypages produits identiques GDD \gg DD en puissance
 - Valeurs génétiques estimées avec plus de précision

Principe de l'analyse de liaison (1)

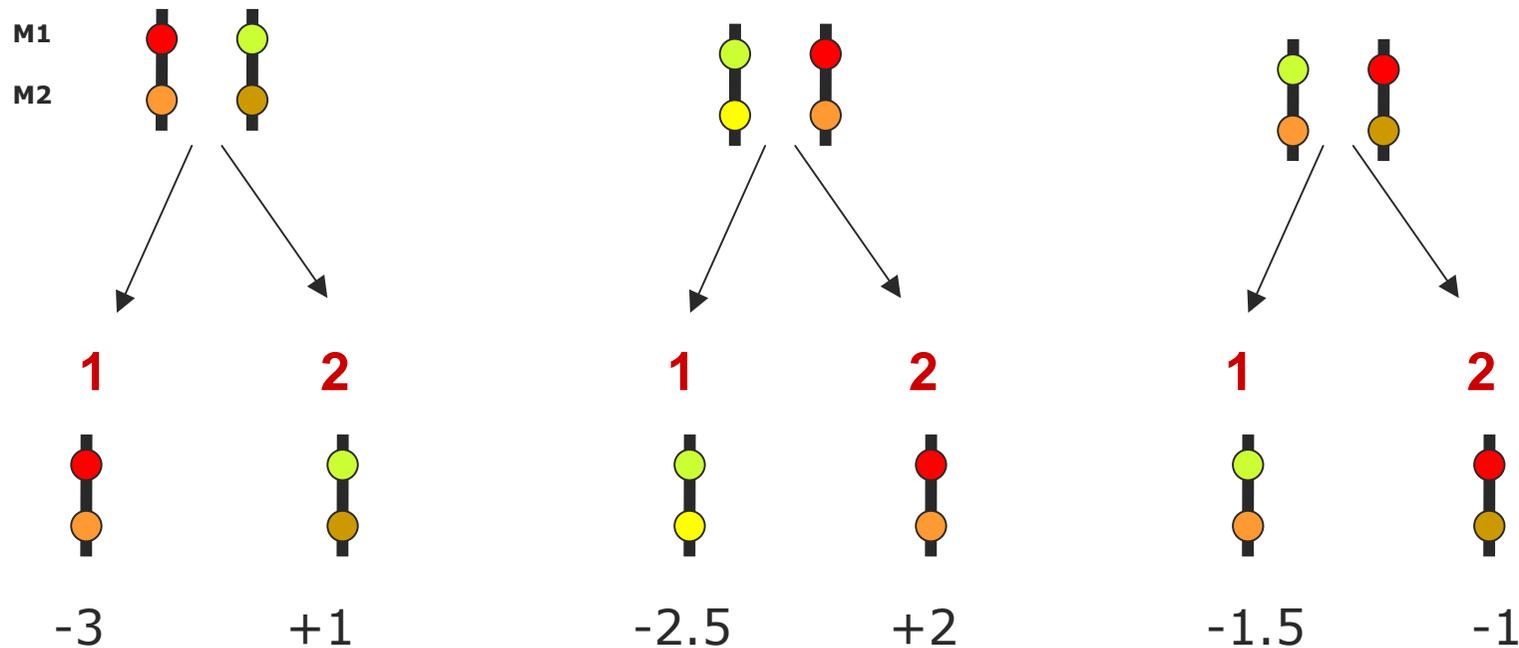
- Question: Est-ce qu'il y a un QTL?
- Information utilisée
 - Contraste entre les valeurs des effets des deux chromosomes du père en la position considérée
 - Mesuré à l'aide des phénotypes des fils
- Avantages:
 - Méthode robuste et rapide
- Limites
 - Seuls les pères hétérozygotes sont informatifs
 - Localisation imprécise
 - Les allèles (ici couleurs) des marqueurs ne renseignent pas sur l'effet de l'allèle au QTL : + ou - !

Principe de l'analyse de liaison (2)



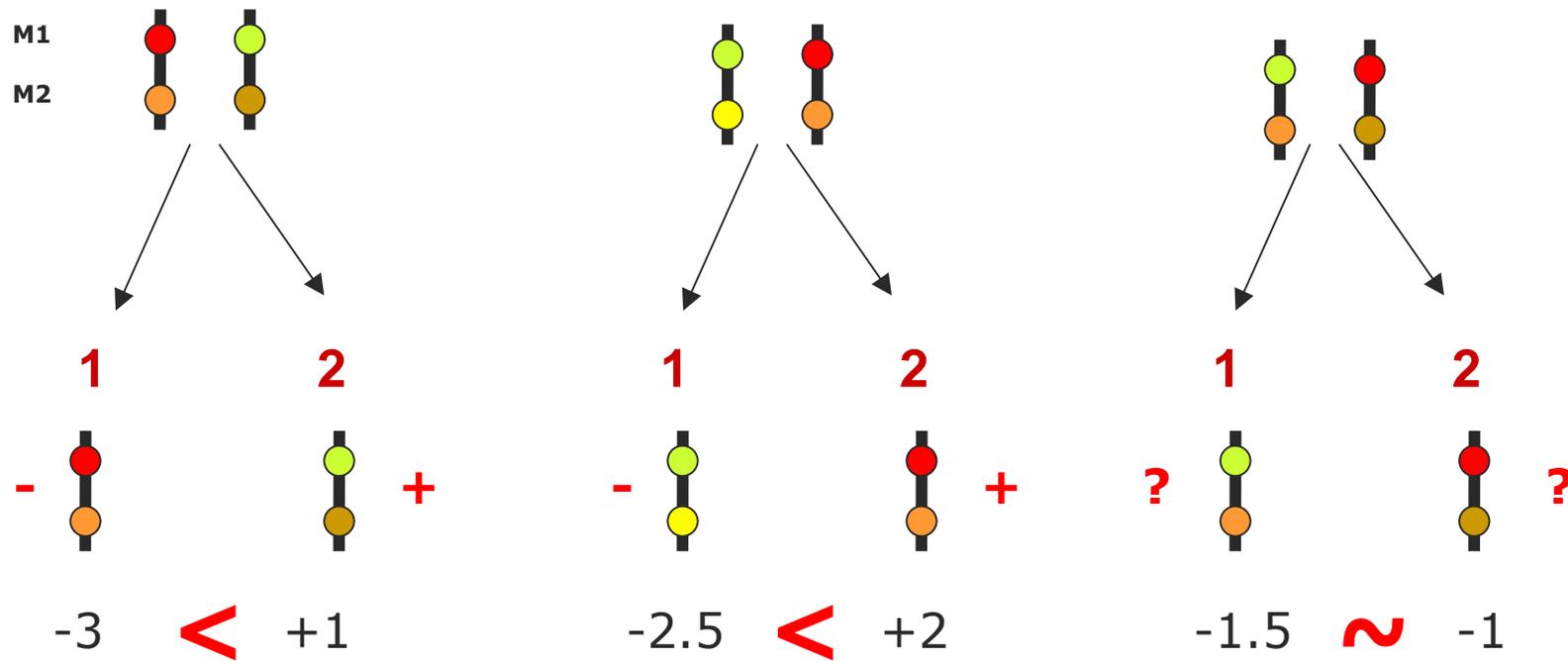
Pour chaque position, on répartit les fils d'un taureau en 2 groupes en fonction de la région chromosomique reçue !

Principe de l'analyse de liaison (3)



Dans chaque famille, on compare les performances des 2 groupes de fils !

Principe de l'analyse de liaison (4)



Il existe un QTL entre M1 et M2 !

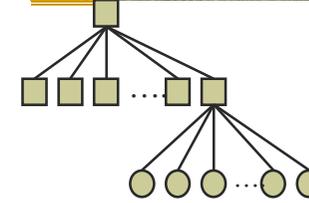
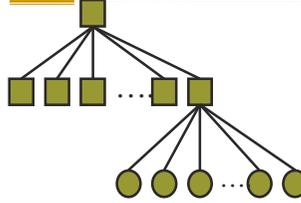
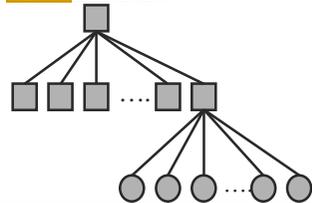
Exemple de QTL déjà décrits

- QTL liés à la fertilité « femelle »
 - TNR (56 jours et 90 jours post IA)
 - Taux de conception (Daughter Pregnancy Rate)
 - Taux d'ovulation
 - Taux de naissance gémellaire
- QTL liés à la fertilité « mâle »
 - TNR (performance propre)
 - Concentration en FSH

Recherche de QTL fertilité femelle chez les bovins laitiers français

- Programme QTL français
 - Partenaires: INRA-Labogena-UNCEIA
 - 1996-1999
- Programme SAM:
 - Partenaires: INRA-Labogena-UNCEIA
 - Débuté en 2000
- Projet pilote
 - Partenaires: CNG-INRA-UNCEIA
 - 2005-2006
- Projet ANR-Genanimal “CartoFine”
 - Partenaires: CNG-INRA-Labogena-UNCEIA
 - 2006-2009

Le point de départ (Boichard et al., 2003)



Pères

Fils

Petite-filles

- 14 familles, 1568 taureaux d'IA
 - 25 caractères : production, fertilité, résistance aux mammites, vitesse de traite, longévité ...
 - Genome scan avec 169 markers
 - Analyses : Interval mapping (régression des indices des taureaux sur l'haplotype hérité du père)
- ➔ >120 QTLs identifiés (au moins 1 par caractère étudié)

Trait	Chromosome
• Production	7, 11, 14, 19, 26
• Milk Composition	3, 6, 14, 18, 20
• Persistency	11
• Mastitis resistance	10, 15, 21
• Fertility	1, 7
• Milking speed	6, 8, 13
• Udder shape	2, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 28
• Teat length	2, 21, 27, 28
• Stature	2, 5, 6, 9, 11, 13, 24
• Legs	7, 15
• Rump	1, 5, 6, 8, 13, 19, 20

Premières applications...

- Le programme SAM
 - Débuté en 2001 (Boichard et al., 2002)
 - Second contrat triannuel
 - contractant : INRA, Labogéna et UNCEIA)
- 14 regions sélectionnées
 - Contenant au moins un QTL
 - caractères de production, Taux cellulaires et fertilité femelle
 - Suivies à l'aide de 45 marqueurs microsatellites

Un nouveau dispositif d'étude

- Extension des dispositifs initiaux (grâce à la SAM):
 - ~80 familles disponibles (>30 sons):
 - 50 en Holstein, 19 en Normandie et 14 en Montbéliarde
- Redéfinition de 3 GDD race-spécifique
 - Maximisation du nombre de pères hétérozygotes aux QTL
 - Eviter la surreprésentation de familles proches
- Composition
 - 26 familles Prim'Holstein : 2138 taureaux d'IA (~70/famille)
 - 9 familles Normandes : 548 taureaux d'IA (~60/famille)
 - 6 familles Montbéliardes : 370 taureaux d'IA (~80/famille)

Validation des QTL de fertilité

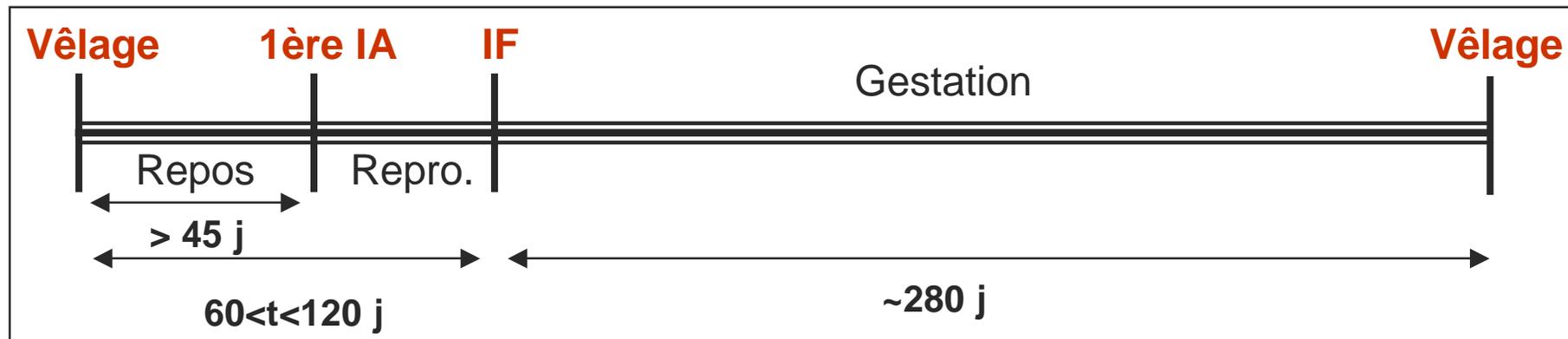
Trait	BTA	1	2	3	6	7	14	15	19	20	21	23	26
Fertility	QTL program	**				**					*		
Fertility	KIT46	*											
Fertility	KIT56	*		**							**		
Fertility	KIT66	**	**	**							*		

* (P<0.05)

** (P<0.01)

- Sur la base des résultats SAM/QTL : bilan contrasté
 - Le QTL sur le BTA07 n'est plus significatif (en large population)
 - Structure initiale biaisée
 - Amélioration de la précision des valeurs génétiques
 - Confirmation du QTL du BTA21 en race Normande seulement
 - Nouveaux QTL identifiés et actuellement étudiés (S. Ben Jemaa)
 - BTA01-BTA02-BTA03

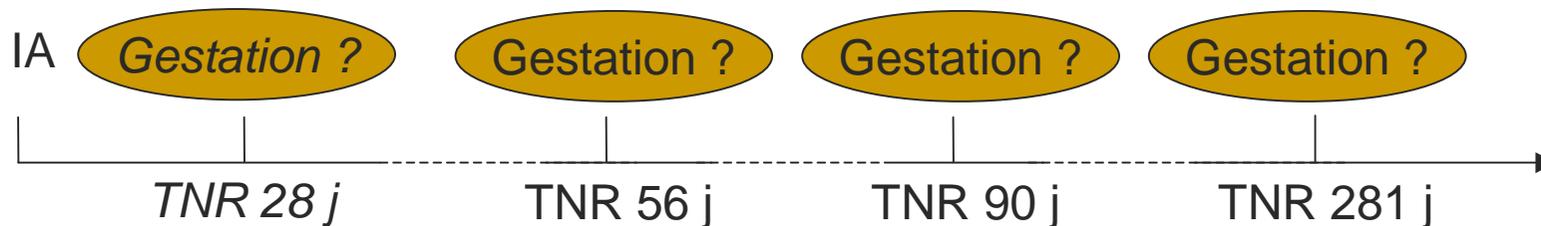
Le caractère de « fertilité femelle »



- En période de repro, quelle est l'IA fécondante parmi les IA pratiquées sur les filles du taureau considéré?
 - les IA réalisées 3 mois avant l'indexation ne sont pas considérées
 - Mise Bas ?
 - Oui: IF est celle située à la date (MB - durée de gestation) ± 15 j
 - Non: dernière IA supposée fécondante si la durée de lactation < 280 j (et > 180 j)

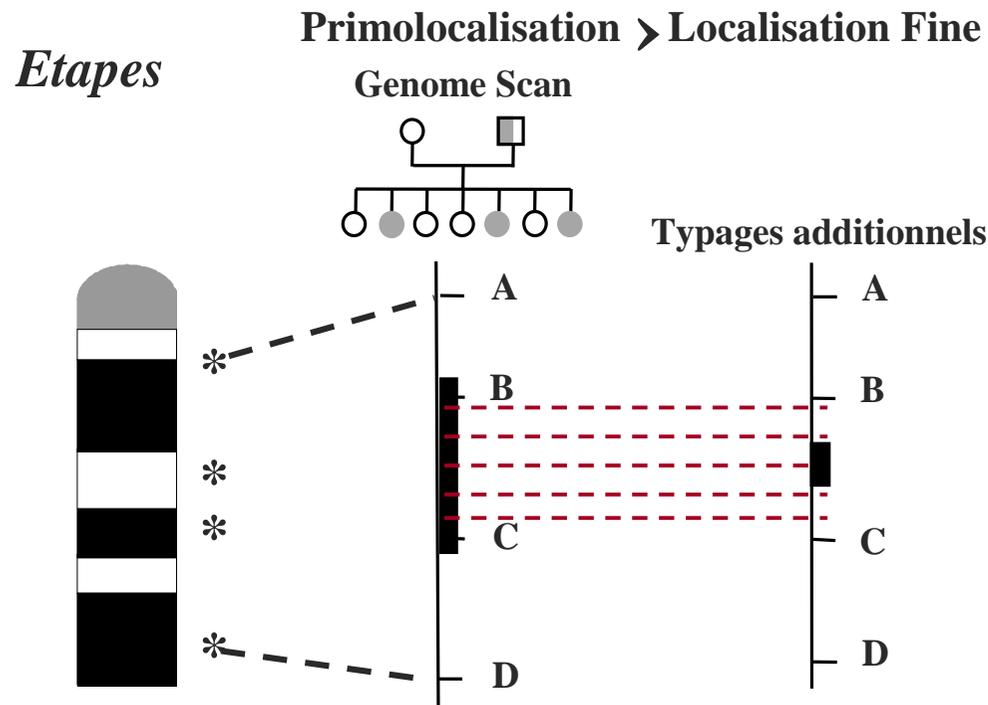
Les limites de cet indice

- Le phénotype ne renseigne que sur la fertilité post-partum
- Développement d'indices intermédiaires
 - Indices calculés à différents stades de la gestation (Guillaume et al., 2007)



- Ces caractères demeurent très peu héritables ($h^2 < 0.02$)

Travaux de cartographie fine



Nouveaux marqueurs dans les zones de primo localisation

- 9 μ sat BTA01 sur 60 cM
- 14 μ sat BTA02 sur 75 cM
- 24 μ sat BTA03 sur 60 cM
- 5 μ sat BTA21 sur 30 cM

Résolution

20-50 cM
(20 - 50 Mb)

5-10 cM
(5 - 10 Mb)

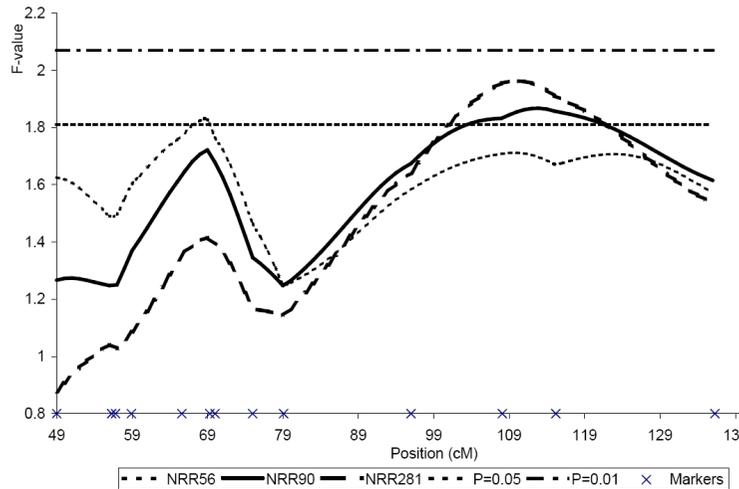
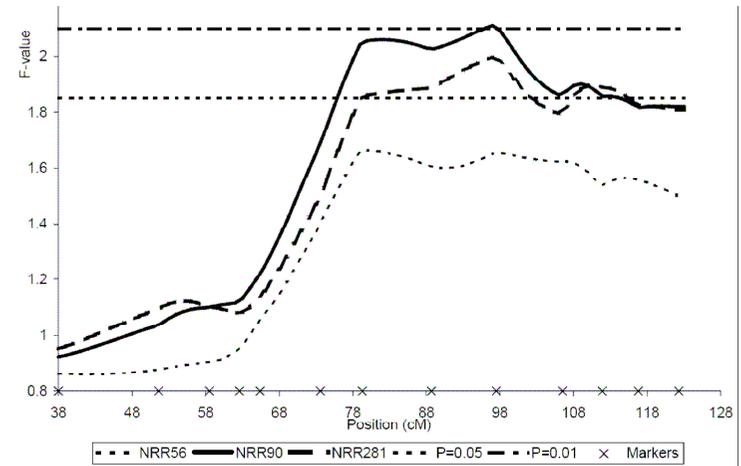
*Utilisation
en sélection*

SAMI

Résultats (Ben Jemaa et al., soumis)

BTA01

- QTL significatifs TNR90 et TNR281
- Explique **18% de la variance génétique du TNR90**

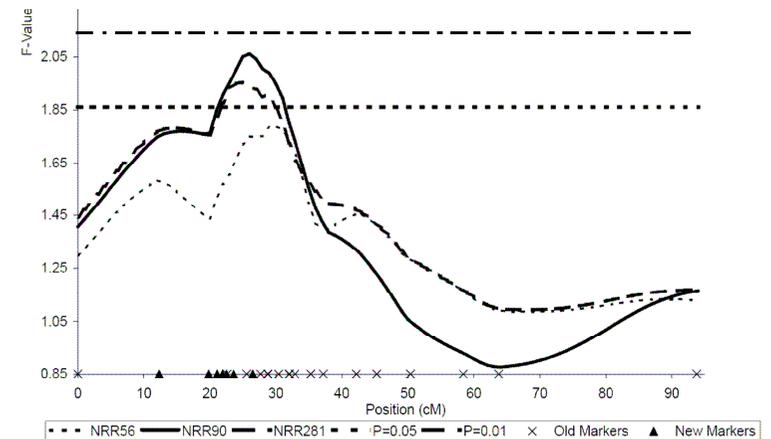


BTA02

- QTL significatifs TNR56 et TNR90
- Explique **11.5% (TNR56)** et **14% (TNR90)** de la variance génétique

BTA03

- QTL significatifs TNR90
- Explique **14% de la variance génétique (TNR90)**



Cartographie fine: vers le haut débit

- **Projet Pilote CNG-INRA-UNCEIA**
- **Objectifs :**
 - Construction de cartes génétiques SNP à haute densité
 - Evaluation des approches de cartographie à haut débit
- **Méthodologie :**
 - **Identification in silico de 1536 SNP**
 - comparaisons de séquences bovines disponibles (EST)
 - localisation prédite sur la base de la carte comparée BTA/HSA
 - **Génotypage (plateforme Illumina)**
 - 1800 individus de 14 races bovines différentes
 - 17 familles Holstein

Rappels sur les SNP

SNP : mutation ponctuelle dans la génome



A

..GAATCTTATGCTATACATAATTATATACTAAT**C**GGGTATTGTTCTTAT..
..CTTAGAATACGATATGTATTAATATATGATTA**G**CCCATAACAAGAATA..

B

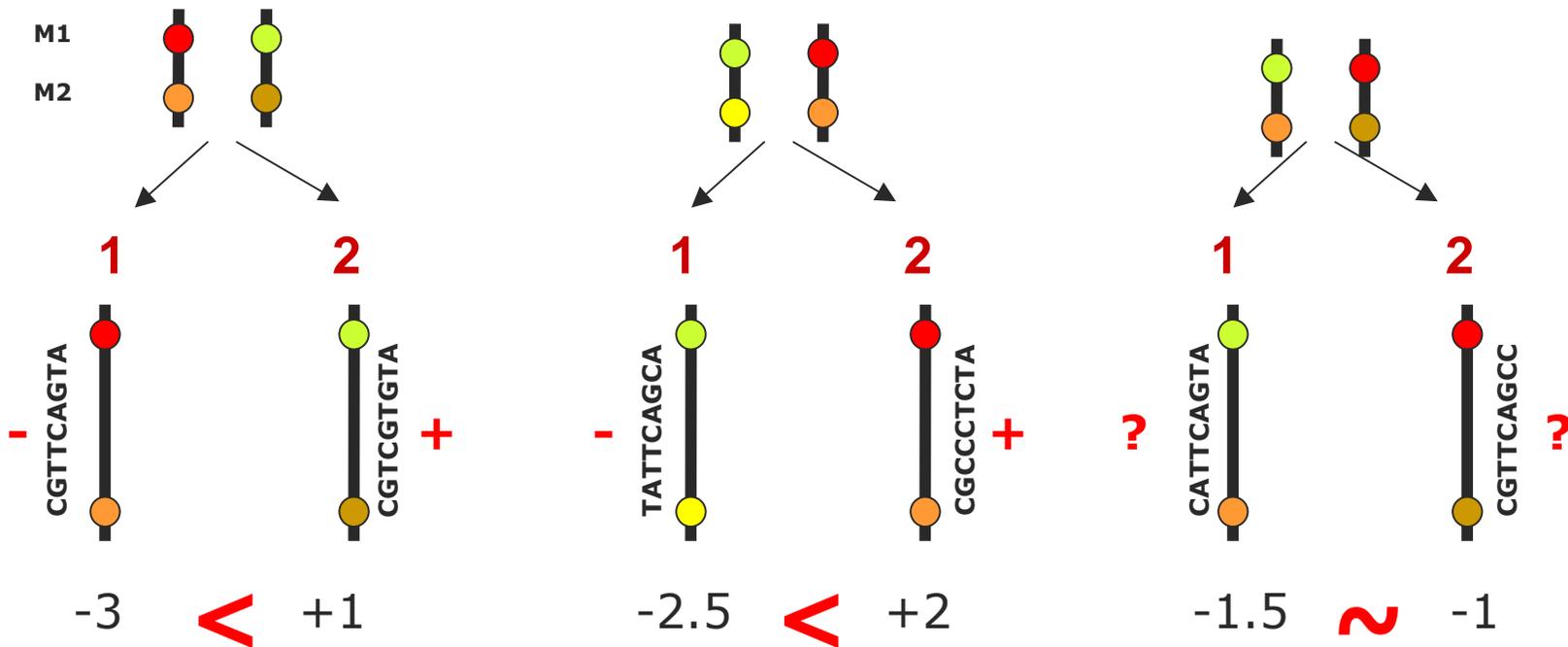
..GAATCTTATGCTATACATAATTATATACTAAT**A**GGGTATTGTTCTTAT..
..CTTAGAATACGATATGTATTAATATATGATTA**T**CCCATAACAAGAATA..

- Marqueurs bi-alléliques associés à des mutations ponctuelles
- Très fréquents (x100 /microsatellites)
- Très forte automatisation possible lors du génotypage

La cartographie fine (1)

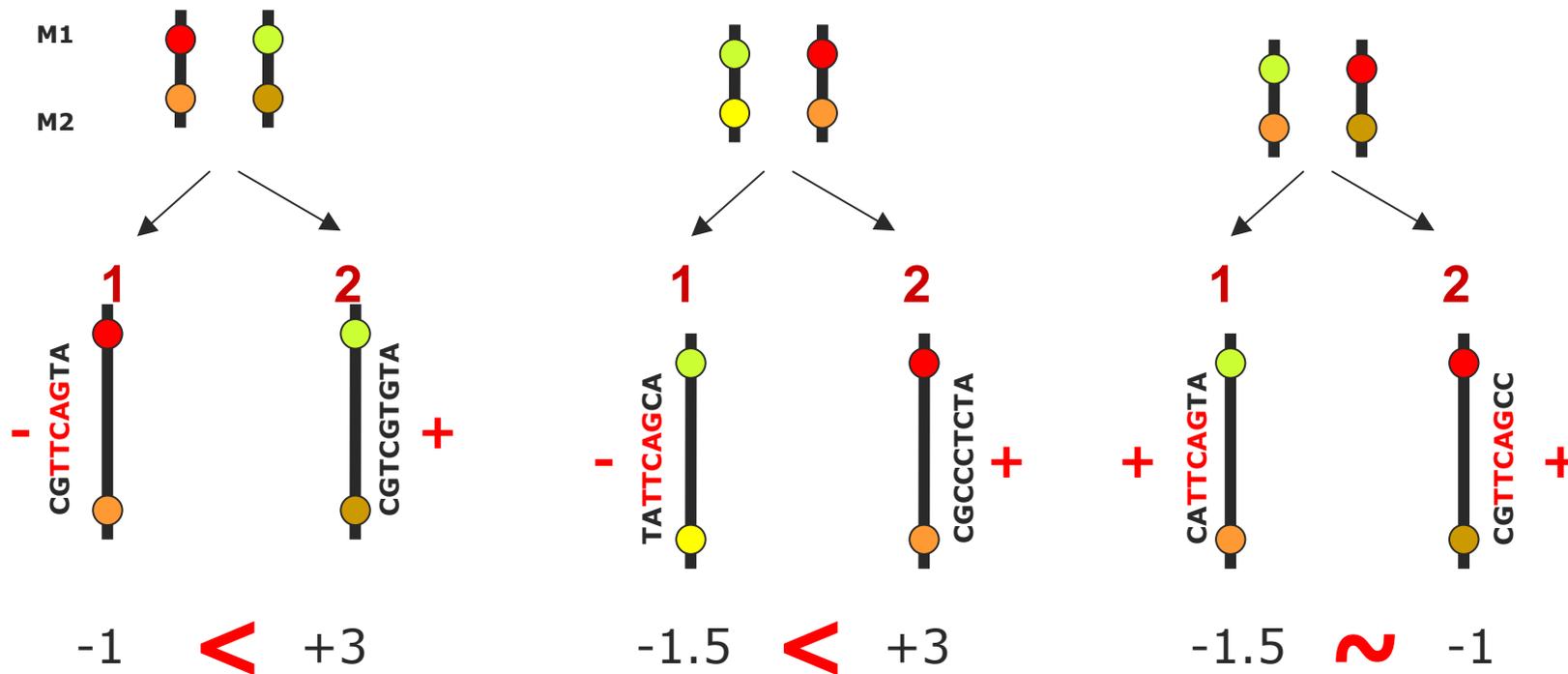
- Question: Où est le QTL?
- Information utilisée
 - On sait qu'il y a un QTL dans la région considérée (analyse de liaison ou LA)
 - Valeur des effets des haplotypes supposés identiques dans la population (valorisation du LD)
- Avantages:
 - Méthode précise mais peu robuste si utilisée seule
 - Nécessité de combiner les deux sources d'information (LA et LD)
 - On connaît les effets des haplotypes (SAM2)
- Limites
 - Celles du dispositif !!!

Principe de la cartographie fine (2)



Saturation de la carte avec des SNPs

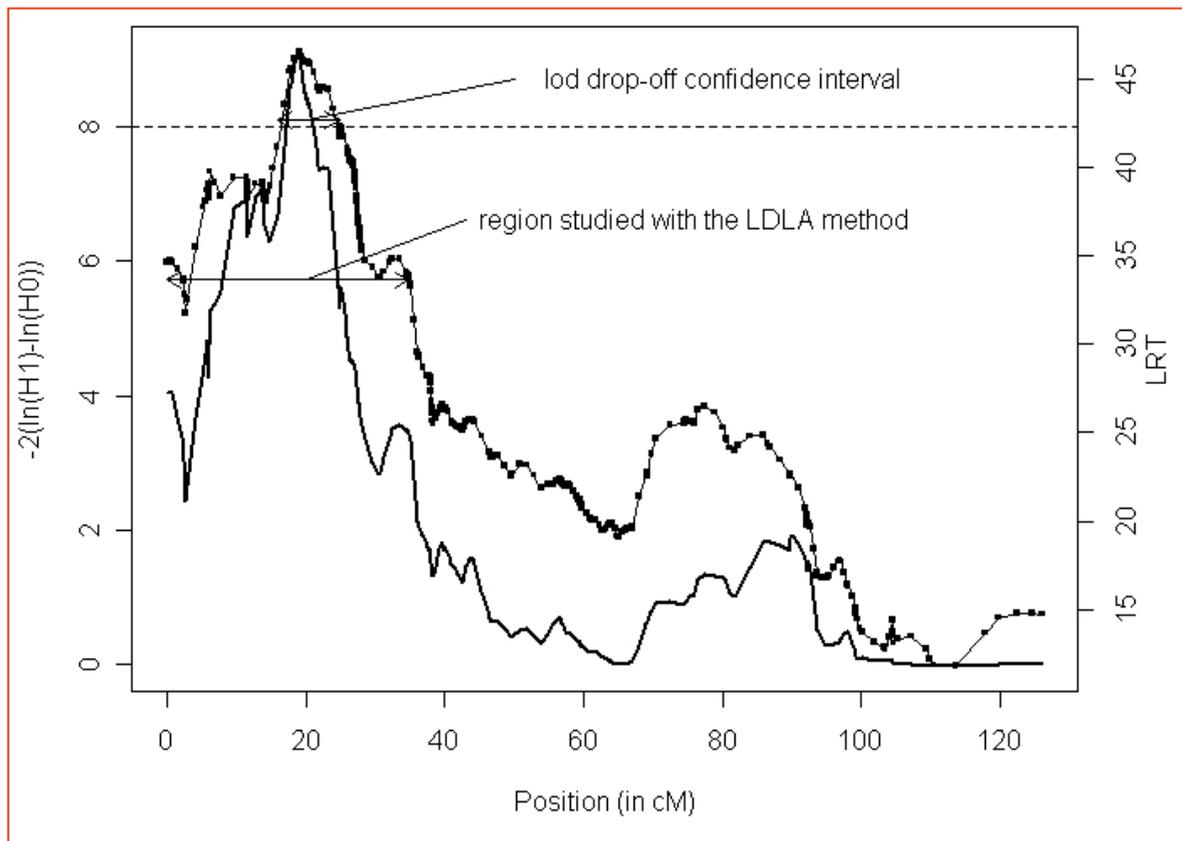
Principe de la cartographie fine (3)



La combinaison de marqueurs TTCAG est associé au - du QTL !

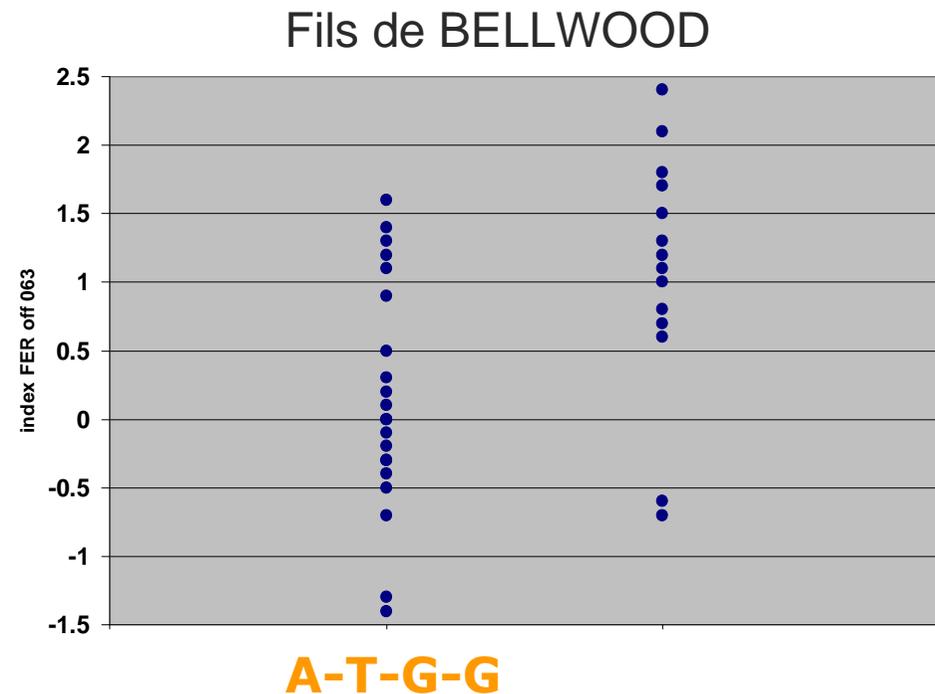
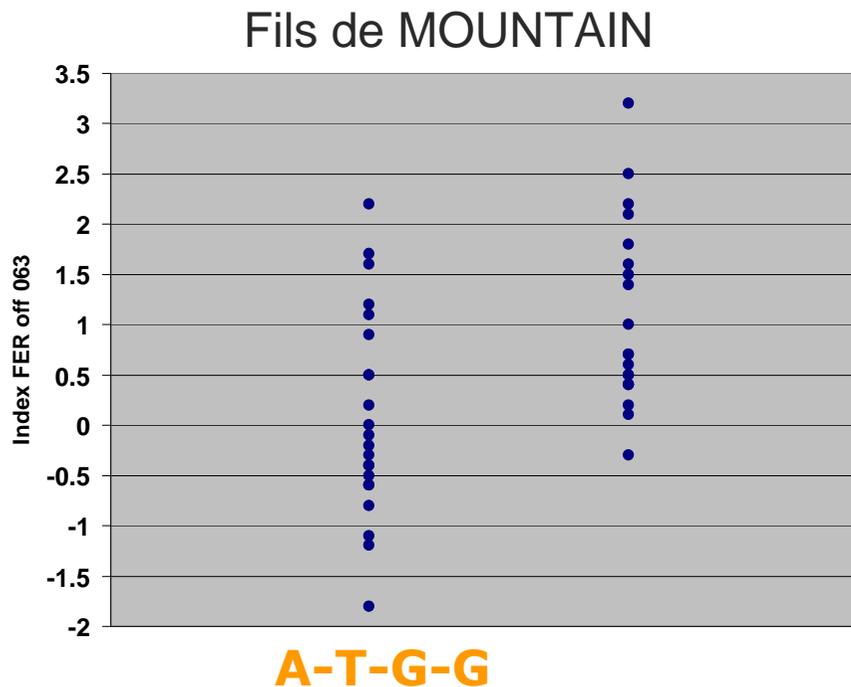
Analyses sur le dispositif Holstein

(Druet et al., soumis)



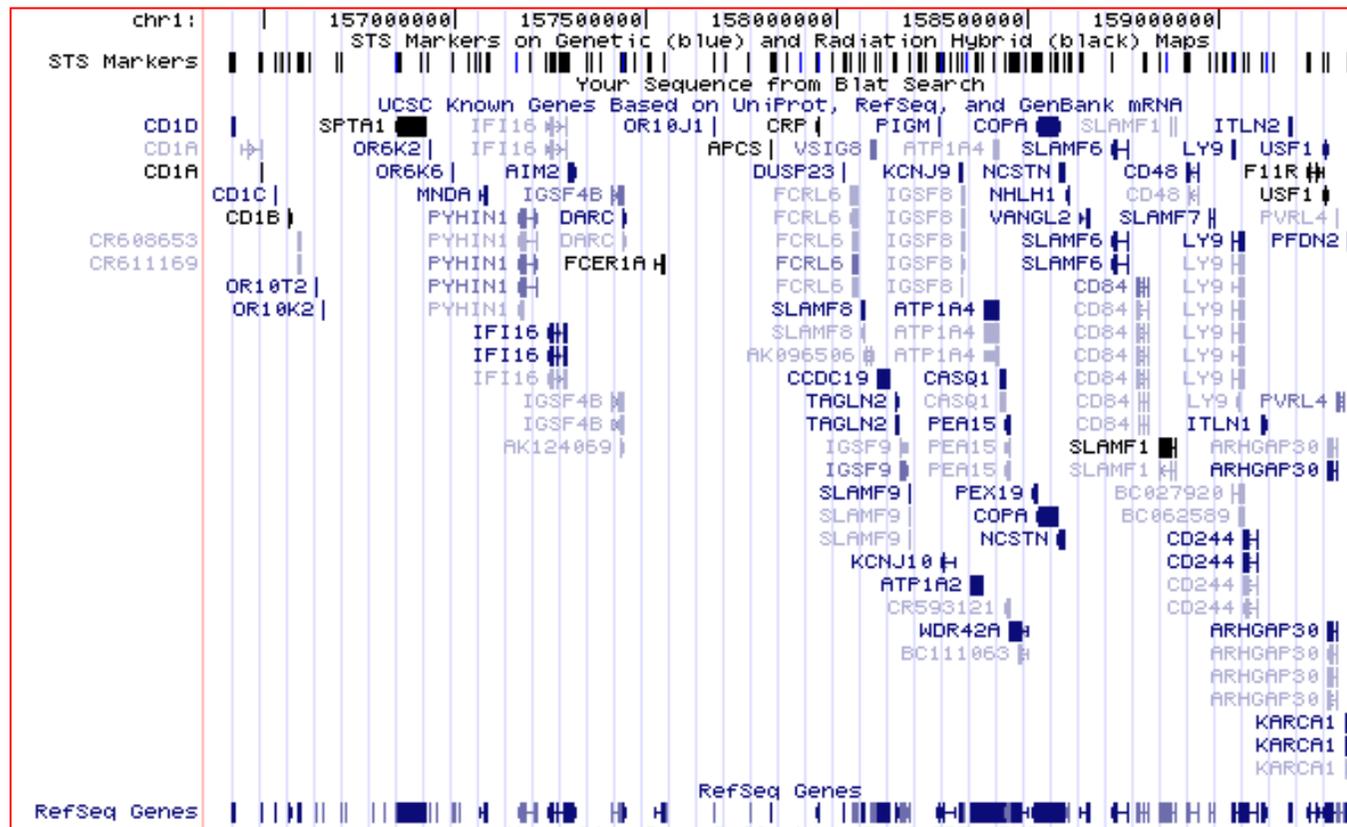
- ✓ Saturation quasi-complète du BTA03 (460 SNP)
- ✓ Confirmation et cartographie fine du QTL simultanément

Effets haplotypiques...



- La combinaison **A-T-G-G** est associée à l'allèle défavorable du QTL !

Contenu en gènes de la région



- 6 gènes candidats (**positionnels et fonctionnels**) de la région sont en cours d'étude

Le Projet Cartofine

- Généralisation de l'approche validée par le projet pilote CNG-INRA (QTL sur le BTA03)
 - Séquençage du génome bovin
 - => puce 60k
 - Disponible avant sa sortie commerciale pour l'INRA
 - 3300 taureaux (69 familles) génotypés sur :
 - 60000 SNP couvrant l'ensemble du génome (~2000/chromosomes)
 - 8 SNP suppl. pour QTL Fertilité du chromosome 3
- ⇒ génotypages attendus avant fin janvier 2008

Le programme « fertilité mâle »

- Programme ANR Genanimal “FER Mâle”
 - Partenaires: INRA-Labogena-UNCEIA
 - 2003-2006
- Objectifs:
 - Recherche d'indicateurs de la fertilité mâle
 - Estimation des paramètres génétiques (cf Basso et al., 2007)
 - Primo localisation de QTL

Le dispositif

- Pedigree de type « Daughter Design »
 - 515 taureaux Prim'Holstein
 - 10 familles de père (40-66 pères par famille)
- Génotypage
 - 150 marqueurs
 - 2-10 marqueurs par chromosome
 - Individus génotypés:
 - 515 fils
 - 10 pères + 150 mères

Les phénotypes

- Semence des taureaux analysée au laboratoire R&D de l'UNCEIA
 - 500 taureaux
 - Anomalies des spermatozoïdes
 - tête, gouttelette, flagelle
 - Quantité de semence
 - Qualité de la semence après décongélation
 - ALH, % de spermatozoïdes progressifs, Mobilité à l'œil, résistance
- Taux de Non Retour
 - mesurés sur les vaches inséminées avec la semence du taureau considéré (performance propre du taureau)

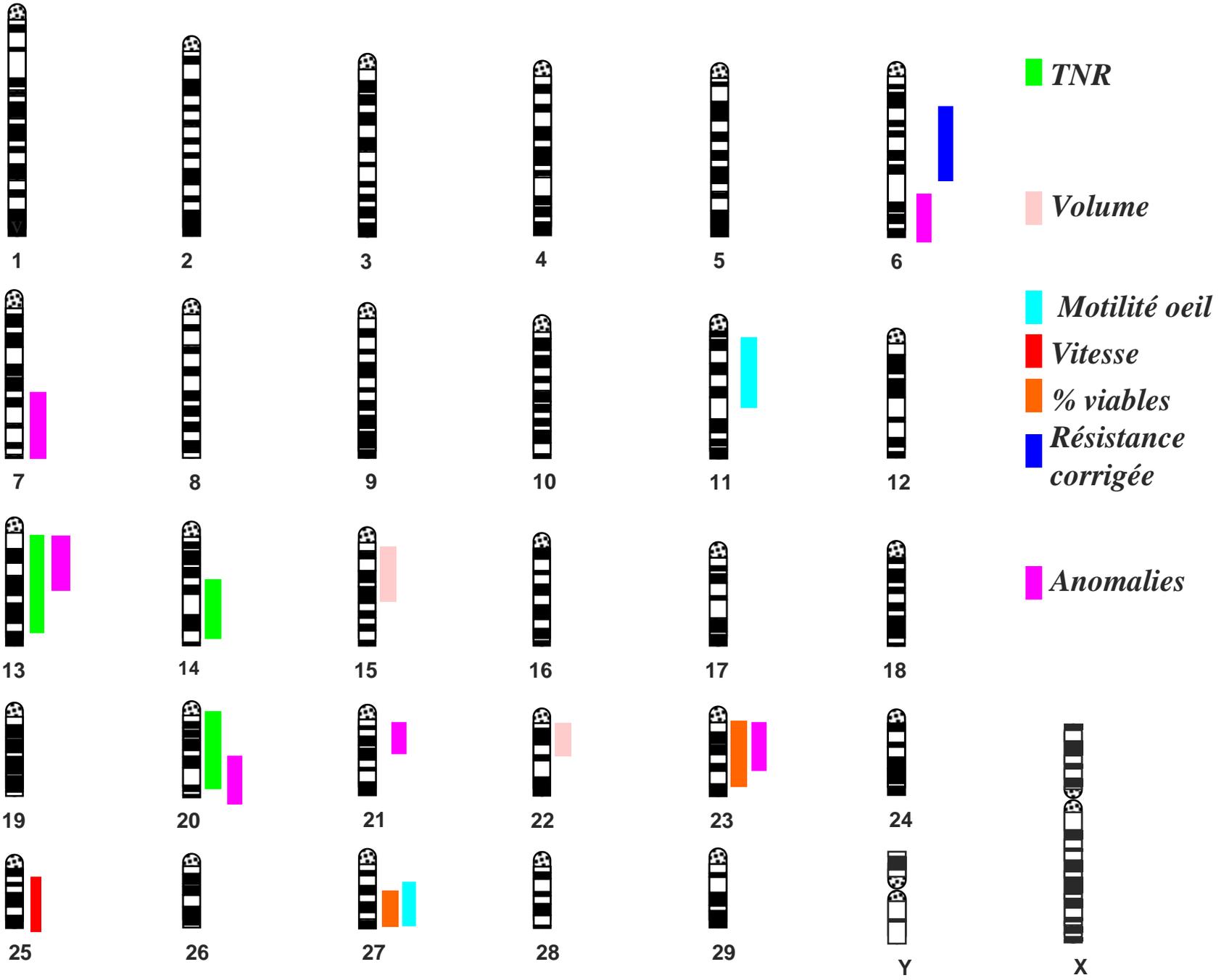
Liens avec la fertilité mâle

	<i>TNR 282</i>
<i>Volume</i>	0.01 (± 0.08)
<i>Concentration</i>	0.08 (± 0.08)
<i>Nb spz</i>	0.04 (± 0.09)

Aucun lien estimé entre la production de semence d'un taureau et sa fertilité de terrain

	<i>TNR 282</i>
<i>Motilité HTM</i>	-0.13 (± 0.09)
<i>% viable</i>	-0.12 (± 0.10)
<i>Vitesse</i>	-0.01 (± 0.09)
<i>% Resistants</i>	0.14 (± 0.06)
<i>Mobilité à l'oeil</i>	0.13 (± 0.06)
<i>Note à l'oeil</i>	0.30 (± 0.06)
<i>% de progressif</i>	-0.27 (± 0.06)
<i>ALH</i>	0.67 (± 0.05)
<i>% Résistants corrigé</i>	0.20 (± 0.06)

Certaines variables présentent des liens significatifs avec la fertilité mâle (ALH, Anomalies)



CONCLUSIONS

- Premiers résultats des efforts consentis depuis ces dernières années:
 - De nombreux QTL liés à la fertilité ont été identifiés
 - Des dispositifs puissants de détection (cf projet Cartofine)
- Premières applications pour le programme SAM
 - Intégration très proche de l'ensemble des régions QTL finement identifiées dans le programme SAM
 - Investissement de la filière (Programme SAM) est un atout essentiel de projet de cartographie de QTL de fertilité
- Encore peu de connaissances sur les mécanismes moléculaires sous-jacents

Perspectives (1)

- **Projet VHLP (2006-2009):**
 - Recherche de 400 génisses issues de pères hétérozygotes au QTL de FER du BTA03
 - Achat de 46 génisses (16 ++ & 20- - au QTL) issues de 5 pères pour le LPRC (INRA-Nouzilly)
 - Etude fine de l'expression des gènes
- **Projet MAMMIFERT (2005-2008)**
 - Cartographie comparée de QTL
 - Valorisation des résultats obtenus sur des espèces modèles (souris, homme)

Perspectives (2)

- **Projet de Thèse (UNCEIA-INRA): S. Ben Jemaa**
 - Cartographie de QTL de fertilité femelle
 - Recherche de polymorphismes causaux dans des gènes candidats
- **Projet Genanimal GENIFER (2005-2008)**
 - Typage de 5000 vaches issues de 12 pères sur les marqueurs de la SAM2 en DL avec tous les QTL de Fertilité
 - Phénotypage fin:
 - constats de gestation & dosages progestérone (entre 0 et 90j post IA)
 - Précision des effets des QTL de Fertilité identifiés (BTA03)

Remerciements

■ INRA

○ LGbC (Jouy-en-Josas)

■ Slim Ben Jemaa, Mekki Boussaha, André Eggen

○ SGQA (Jouy-en-Josas)

■ Tom Druet, François Guillaume, Benjamin Basso, Didier Boichard

■ Partenaires professionnels

○ UNCEIA

■ Sébastien Fritz, Alain Malafosse, Patrice Humblot

○ Unités de sélection

■ UMOTEST, Jura Bétail, GNA, GENOE, MIDATEST, URCEO, AMELIS, GDO et L'AIGLE

■ CNG (Evry)

○ Ivo Gut