

ETUDE GÉNÉTIQUE DE DEUX POPULATIONS OVINES (HAMRA ET OULED-DJELLAL) : CARACTÉRISATION PAR LES MICROSATELLITES

S. GAOUAR (1), K. MOAZAMI-GOUDARZI (2), N. TABET-AOUEL (1), A. DERRAR (3),
R. AIT-YAHIA (3), N. BOUSHABA (3), M. AOUISSAT (4), L. DHIMI (5), N. SAIDI-MEHTAR (1).

- (1) - Laboratoire de biologie moléculaire et génétique, Université d'Oran, Algérie.
(2) - Laboratoire de génétique biochimique et cytogénétique, INRA de Jouy-en-Josas, Paris, France.
(3) - Laboratoire de génétique moléculaire et cellulaire, USTO, Oran, Algérie.
(4) - ITELV de Aïn El-Hadjjar, Saïda, Algérie.
(5) - ITELV de Aïn M'Lila, Constantine, Algérie.

RÉSUMÉ

Ce travail est une contribution à la caractérisation génétique de deux races ovines algériennes (Hamra et Ouled-Djellal) par l'étude du polymorphisme de l'ADN pour 12 microsateellites en utilisant le séquenceur automatique précédé d'une amplification *in vitro* des ADN par PCR. Les résultats obtenus ont permis d'avoir une première estimation de la variabilité génétique de ces deux races, basée sur le nombre d'allèles observés et leurs fréquences dans les populations étudiées. La race Ouled-Djellal apparaît comme plus polymorphe avec un nombre d'allèles de 125 par rapport à la race Hamra qui présente 104 allèles. La capacité identificatrice des marqueurs microsateellites, déduite de la comparaison des deux races, reste relative et ne prendra sa pleine signification qu'après extension de cette étude aux autres races locales.

Mots clés : Populations ovines, Microsateellites, Polymorphisme, Caractérisation génétique.

ملخص

عملنا هذا هو مساهمة في التشخيص الوراثي لسلاطين من الضأن الجزائري (أولاد جلال و الحمراء) و هذا بدراسة التنوع الصنفي على الـ ADN (الحمض الريبسي النووي المنقوص الأكسجين) بـ 12 موسم من نوع الميكروستلات (microsatellites) و هذا باستخدام تقنية جزيئية الـ PCR التي تمكننا من الحصول على تعدد صنفى للـ ADN المدروس متبوعة باستخدام جهاز خاص المشفر (séquenceur) الذي يسمح لنا بتحليل النتائج. النتائج المحصل عليها سمحت لنا بالحصول على نظرة أولية للتنوع الوراثي لهاتين السلاطين على قاعدة عدد الصفات المشاهدة و نسبتها عند المجموعات المدروسة. و يتبين لنا من هذه النتائج أن سلالة أولاد جلال أكثر تنوعا (125 صفة) بالمقارنة مع سلالة الحمراء (104 صفة). عندما قارنا السلاطين فيما بينهما تبين لنا أن الموسومات المدروسة لها قدرة تصنيفية لكن هذه الملاحظة تبقى نسبية و تخص هذه السلاطين فقط.

الكلمات المفتاحية : سلاطين الضأن، ميكروستلات، التنوع الصنفي، التشخيص الوراثي.

INTRODUCTION

En Algérie, le mouton est le seul animal à pouvoir tirer profit des 12 millions d'hectares de steppe et est la principale source de production de viande. Ce travail a pour objectif d'identifier génétiquement les races ovines indigènes, ce qui permettrait de mieux les préserver et de pallier aux problèmes de perte de la variabilité génétique au niveau des populations étudiées. En effet, l'estimation de la variabilité génétique est un paramètre très important à prendre en considération dans toute stratégie de préservation et/ou de conservation des races. Le but de cette recherche est l'étude de la variabilité génétique des races ovines algériennes : Hamra, Ouled-Djellal, Rumbi, Tâadmit, D'men, Sidaoun (Targuia), Barbarine et Berbère.

Ce travail s'inscrit dans un cadre de recherche scientifique appliqué qui vise à valoriser et améliorer le cheptel ovin autochtone. L'étude est basée sur la recherche du polymorphisme au niveau de l'ADN et la mise en évidence de polymorphismes génétiques particuliers à ces races ovines (en comparaison notamment avec ceux des races françaises et africaines), ce qui devrait permettre de mieux apprécier leur originalité et d'en assurer éventuellement la préservation.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Animaux

Pour chacune des races, nous avons constitué un lot d'une trentaine à une cinquantaine d'animaux non apparentés : 35 pour Hamra et 50 pour Ouled-Djellal. La race Ouled-Djellal aurait été introduite par les Béni-Hilal venus en Algérie au XI^{ème} siècle, du Hidjaz (Arabie). Cependant, les races ovines du Moyen-Orient et d'Asie sont toutes des races barbarines à queue grasse. Pour cette raison, la race Ouled-Djellal à queue fine et laine fine aurait été

introduite plutôt par les romains, grands amateurs de laine, au V^{ème} siècle avant J.C. venant de Tarente en Italie où ce type de mouton existe toujours. Il est d'ailleurs représenté sur les stèles funéraires des ruines de Timgad (CHELLIG, 1992). L'effectif des moutons Ouled-Djellal constitue presque la moitié de l'effectif ovin algérien. Cette race est répartie sur presque l'ensemble du pays, mais on la trouve surtout au Centre et à l'Est. Le mouton Ouled-Djellal est un animal puissant, qui présente un squelette un peu fort, une ligne dorsale bien droite et un rein assez ample. La toison de couleur blanche est souvent courte, descendant jusqu'aux jarrets et aux genoux et s'arrêtant généralement sur la nuque à la limite des cornes. Cette race est considérée comme la principale race pour la production de viande (CHELLIG, 1992).

La race Hamra, dite Béni-Ighil est autochtone d'Afrique du Nord, plus précisément du haut atlas marocain où elle est élevée par la tribu Béni-Ighil. L'effectif de cette race était estimé à 3 millions 200 milles têtes en 1983 (CHELLIG, 1992). Cet effectif a beaucoup diminué ces dernières années ; il est actuellement de l'ordre de 300 milles têtes. Cette diminution est due surtout à l'introduction massive, par les éleveurs, de la race Ouled-Djellal dans le berceau de la race Hamra avec remplacement de cette dernière par Ouled-Djellal. La race Hamra est localisée surtout au niveau de la région Ouest de la steppe jusqu'à la frontière marocaine. Toute en rondeur, elle a une conformation idéale de mouton à viande, et une finesse remarquable de l'ossature. A cause de ses qualités organoleptiques, elle était aussi préférée à toutes les autres races sur le marché de France sous le nom de mouton d'Oranie. Ce mouton, de petite taille, se distingue par une tête et des pattes marron foncé tendant vers le rouge. La laine est blanche avec du jarre allant au brun roux. Les cornes spiralées sont de taille moyenne, la queue est fine et de longueur moyenne (CHELLIG, 1992).

Marqueurs

Pour réaliser cette étude, on a choisi les microsatellites, à cause des nombreuses caractéristiques qu'ils présentent : techniques (manipulation facile) et génétiques (abondance au niveau du génome, polymorphisme important,...). En effet, la caractérisation des microsatellites choisis n'obéissait pas à des conditions techniques très contraignantes ; la seule restriction était qu'ils ne soient pas localisés au niveau de régions chromosomiques très proches les uns des autres, afin de permettre une représentation non biaisée du génome.

Notre sélection de marqueurs moléculaires, à partir de la carte ovine génétique ovine (DE GORTARI *et al.*, 1998), a abouti au choix de 12 microsatellites localisés sur 10 chromosomes différents. La localisation de ces microsatellites est indiquée entre parenthèses : MCM42 (chr.9), OarFCB20 (chr.2), MAF65 (chr.15), TGLA53 (chr.12), MCM527 (chr.5), INRA49 (chr.1), OarFCB11 (chr.2), OarCP49 (chr.17), OarHH56 (chr.20), MAF36 (chr.22), ILSTS05 (chr.7) et CSSM66 (chr.9). Ces microsatellites sont d'origine ovine ou bovine et présentent un nombre d'allèles variant de 9 à 28.

Méthodologie

L'ADN a été extrait par la technique au NaCl (MILLER *et al.*, 1989), car elle présente les avantages suivants : facilité et rapidité de manipulation. Par ailleurs, il n'y a pas de risque d'intoxication par des produits dangereux tel que le phénol. Les microsatellites sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces marquées par différents fluorophores ; les allèles sont identifiés par un séquenceur automatique au fur et à mesure de leur migration sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Les fréquences alléliques sont calculées par comptage direct ; une analyse très minutieuse des fréquences alléliques obtenues a été réalisée pour déterminer le microsatellite à prendre comme référence pour la caractérisation moléculaire et d'iden-

tification des races l'une par rapport à l'autre, ainsi qu'à l'identification des individus. Concernant le taux d'hétérozygotie, en raison du faible nombre d'animaux typés par microsatellite, seules les valeurs des taux d'hétérozygotie théoriques non biaisées (NEI, 1978) ont été prises en compte. Pour vérifier si les populations étaient en équilibre de Hardy-Weinberg, c'est-à-dire en panmixie, nous avons calculé la valeur du F-statistique (F_{IS}), paramètre qui nous permet de confirmer ou d'infirmer l'équilibre panmixique d'une population pour un caractère donné. En effet, cette valeur est négative ou proche de 0 pour des populations en équilibre. Par contre, elle tend vers 1 en absence d'équilibre (WRIGHT, 1965). Nous avons utilisé le programme Exel (Microsoft, 1997) pour l'ensemble des calculs.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

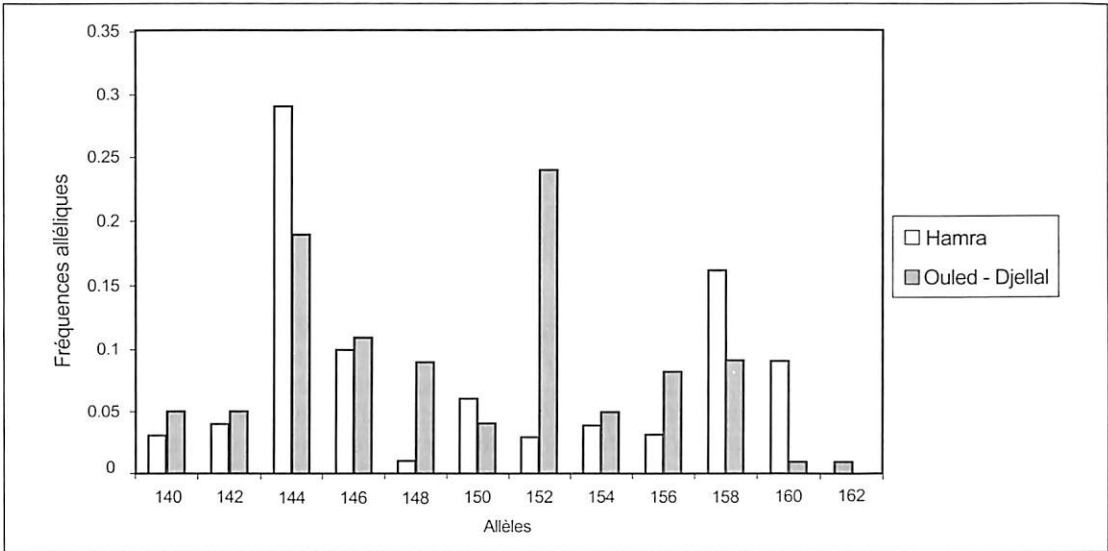
Les résultats obtenus ont permis :

- La mise en évidence d'un nombre important d'allèles différents qui est de 141 allèles au total pour les 2 races et pour l'ensemble des microsatellites : 125 allèles pour la race Ouled-Djellal et 104 allèles pour la race Hamra.
- L'analyse de la distribution de ces allèles, qui a été faite par race (en type d'allèles et en fréquences alléliques), ainsi que la comparaison de ces données chez les 2 races étudiées permet de déterminer le rôle «*identificateur*» de chaque microsatellite vis-à-vis de ces 2 races (population et/ou individu).

En effet, ces microsatellites pourraient être repartis en 2 groupes selon leur pouvoir identificateur :

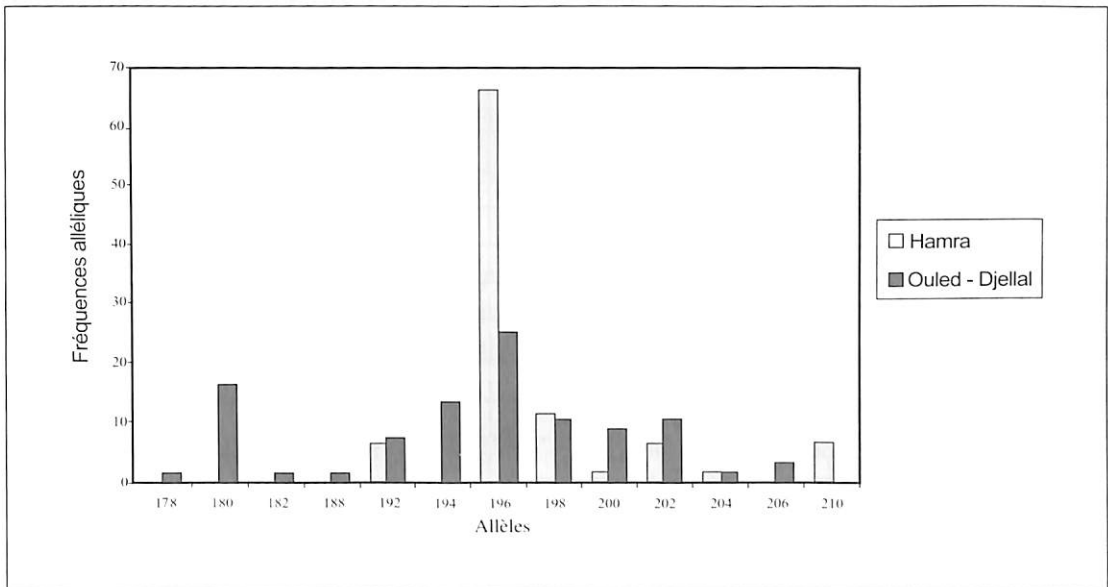
- a) - ceux qui pourraient jouer un rôle seulement dans l'identification des populations (mêmes types d'allèles mais des fréquences alléliques différentes chez les 2 races et/ou présence d'allèles spécifiques pour chaque race), mais à des degrés différents les uns par rapport aux autres. C'est le cas des microsatellites : MCM42, TGLA53, MAF65, OarCP49, OarFCB11, CSSM66 et OarHH56 (figure 1).

Figure 1 : Histogramme des fréquences alléliques du microsatellite TGLA 53 par race.



b) - ceux qui pourraient jouer un rôle à la fois dans l'identification des populations et l'identification des individus grâce à la présence d'allèles spécifiques pour chaque race. C'est le cas des microsatellites : MCM527, ILSTS05, OarFCB20, INRA49 et MAF36 (figure 2).

Figure 2 : Histogramme des fréquences alléliques du microsatellite ILSTS par race.



- MCM527 : les allèles spécifiques les plus importants sont 178 (13 %) pour la race Ouled-Djellal et 176 (4 %) pour la race Hamra.
 - ILSTS05 : les allèles spécifiques les plus importants sont 210 (6,45 %) pour la race Hamra, 180 (16,18 %) et 194 (13,24 %) pour Ouled-Djellal.
 - OarFCB20 : l'allèle spécifique le plus important est 115 (11 %) pour la race Ouled-Djellal.
 - INRA49 : l'allèle spécifique le plus important est 159 (15 %) pour la race Hamra.
 - MAF36 : l'allèle spécifique le plus important est 130 (6 %) pour la race Ouled-Djellal.
- Il est évident qu'en raison des faibles fréquences des allèles spécifiques leur présence est indispensable pour l'identification des individus. L'analyse des fréquences génotypiques a permis de constater, d'une part la faible fréquence de certains génotypes et d'autre part l'absence de nombreuses combinaisons génotypiques. Ces résultats sont attendus en raison de la petite taille de l'échantillon de chacune des populations étudiées.

Nous avons aussi remarqué que pour sept microsatellites (MCM527, OarFCB20, INRA49, OarCP49, CSSM66, MAF36 et OarHH56), le génotype le plus fréquent chez la

race Hamra est hétérozygote tandis qu'il est homozygote chez la race Ouled-Djellal. En effet, cette dernière présente un taux d'hétérozygotie moyen (\overline{hnb}) légèrement supérieur à celui de la race Hamra (tableau I). Cette observation peut être expliquée par l'hétérogénéité des valeurs des fréquences alléliques de la race Hamra par rapport à celles observées chez la race Ouled-Djellal.

Concernant les fréquences génotypiques, elles n'ont qu'une valeur indicatrice et fournissent une première idée sur les combinaisons génotypiques les plus fréquentes chez ces races. En effet, la petite taille de l'échantillon étudié, et le nombre élevé d'allèles mis en évidence, ne permettent pas de déterminer les fréquences génotypiques réelles. Seules des études réalisées sur des échantillons plus grands, permettront d'estimer avec précision ces fréquences.

Les résultats des tests statistiques indiquent que ces deux races présentent d'une part une grande variabilité génétique pour les 12 marqueurs étudiés (tableau I) et que, d'autre part, elles sont en panmixie, donc en équilibre de Hardy-Weinberg suivant les valeurs du F_{is} moyen qui sont toutes négatives (tableau II).

Tableau I : Valeurs des taux d'hétérozygotie par microsatellite et par race.

Microsatellites		Hamra	Ouled-Djellal	\overline{hnb}/ms
MCM 42	hnb	0.588	0.747	0.667
TGLA 53	hnb	0.889	0.88	0.884
MAF 65	hnb	0.743	0.785	0.764
MCM 527	hnb	0.821	0.825	0.823
OarFCB 20	hnb	0.827	0.857	0.842
INRA 49	hnb	0.734	0.637	0.685
OarCP 49	hnb	0.737	0.899	0.843
OarFCB 11	hnb	0.726	0.799	0.777
CSSM 66	hnb	0.819	0.840	0.853
MAF 36	hnb	0.866	0.831	0.826
OarHH 56	hnb	0.640	0.627	0.641
ILSTS 05	hnb	0.546	0.87	0.706
$\overline{hnb}/race$		0.744	0.8	

hnb : taux d'hétérozygotie non biaisé, hnb : taux d'hétérozygotie non biaisé moyen,
ms : microsatellite

Tableau II : Valeurs du F_{IS} par microsatellite pour les races Hamra et Ouled-Djellal.

Microsatellites	F_{IS} (Hamra)	F_{IS} (Ouled-Djellal)
MCM 42	-0.331	-1.985
TGLA 53	-4.365	-3.638
MAF 65	-1.363	-2.55
MCM 527	-2.817	-3.084
OarFCB 20	-2.061	-3.875
INRA 49	-1.656	-0.587
OarCP 49	0.11	-0.029
OarFCB 11	-0.149	0.064
CSSM 66	0.045	0.069
MAF 36	-0.103	0.017
OarHH 56	0.276	0.433
ILSTS 05	0.22	0.28
F_{IS} moyen	-1.016	-1.24

Nous disposons donc de 2 échantillons représentatifs de ces 2 races qui pourront être utilisés comme outil de base pour élargir cette étude par :

- l'exploration du génome ovin par un nombre plus élevé de marqueurs microsatellites ;

- l'analyse d'autres races appartenant au cheptel ovin d'Algérie voire d'Afrique du Nord telles que : Tâadmit, Rumbi, D'men, Barbarine, Berbère et Targhia-Sidaoun.

En effet, seuls les résultats de l'étude de l'ensemble des races peut fournir des données intrinsèques de leur pouvoir de caractérisation génétique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail est considéré comme préliminaire car, d'une part il n'a été réalisé qu'avec un nombre moyen de marqueurs (12 marqueurs au

lieu d'un minimum de 20 loci indépendants, TAKEZAKI et NEI, 1996), et d'autre part, il n'a porté que sur la comparaison de 2 races : Hamra et Ouled-Djellal, ce qui a permis de faire une première estimation de la variabilité génétique de ces races et leur comparaison relative, l'une par rapport à l'autre. L'étude de la caractérisation génétique, basée sur l'analyse du polymorphisme de l'ADN est le premier travail effectué sur le cheptel ovin algérien en général, et sur les races Hamra et Ouled-Djellal en particulier. Pour cette étude où douze microsatellites ont été utilisés, le taux d'hétérozygotie moyen observé pour l'ensemble des microsatellites est de 0,7 ce qui traduit une variabilité génétique assez importante des races étudiées. Sur les 85 animaux testés, un nombre total de 141 allèles a été décrit. Les fréquences alléliques observées pour les douze microsatellites ont été discutées en comparant les deux races entre elles et en mettant en valeur la capacité identifiatrice de chaque microsatellite pour ces deux races. Il apparaît que chaque

microsatellite avait un niveau d'identification insuffisant mais intéressant pour une première étude : le moins bon serait le microsatellite TGLA53 et le meilleur serait le microsatellite MCM527 et cela d'après les critères précédemment mentionnés. Cette étude, élargie à un plus grand nombre de races composant le cheptel ovin algérien, permettrait de préciser un certain nombre de caractéristiques moléculaires qui rendra plus facile l'identification des races surtout celles dont les traits physiques ne permettent qu'une distinction approximative. Elles permettront aussi le contrôle de filiation et dans un avenir proche, grâce à l'avènement de l'économie de marché, le contrôle des labels. De plus l'estimation de la variabilité génétique de chaque race à partir des fréquences alléliques, permettrait la mise en place d'une stratégie à l'échelle nationale autorisant à moyen terme la conservation et la préservation de la biodiversité zoologique et à long terme l'amélioration des races locales pour les rendre plus aptes à répondre aux besoins économiques du pays.

Références bibliographiques

- CHELLIG R., 1992. Races ovines algériennes. Office des publications universitaires.
- DE GORTARI M.J., FREKING B.A., CUTHBERTSON R.P., KAPPES S.M., KEEL J.W., STONE R.T., LEYMASTER K.A., DODDS K.G., CRAWFORD A., BEATTIE C.W., 1998. A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm. Genome* 9, 204-209.
- MILLER S.A., DYKED D.D., POLESKI H.F., 1989. A simple salting out procedure for extraction of DNA from human nucleate cells. *Nucleic acid* 16, 1215.
- NEI M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from number of individuals. *Genetics* 89, 583-592.
- TAKEZAKI N., NEI M., 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389-399.
- WILSON E.O., 2000. L'enjeu écologique n°1. *La Recherche* 333, 14-16.
- WRIGHT S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19, 395-420.